



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΝΕΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΣΤΗΝ ΚΥΣΤΙΚΗ ΙΝΩΣΗ»**

**ΕΛΕΝΗ ΜΠΙΛΙΟΥΡΗ**  
**ΙΑΤΡΟΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ**, Καθηγήτρια Γενετικής Παν/μίου Θεσσαλίας (Επιβλέπουσα)  
**ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ**, Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας Παν/μίου Θεσσαλίας  
(Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)  
**ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας Παν/μίου Θεσσαλίας  
(Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)

**ΛΑΡΙΣΑ, 2018**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**“NEW THERAPIES IN CYSTIC FIBROSIS”**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Κυστική Ίνωση (ΚΙ) είναι μία από τις πιο κοινές θανατηφόρες γενετικές ασθένειες. Παρουσιάζει αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας και οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR), το οποίο κωδικοποιεί ένα κανάλι μεταφοράς ιόντων. Σε αυτήν την εργασία ανασκοπείται η σύγχρονη βιβλιογραφία με στόχο την περιγραφή των νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων γύρω από τη νόσο. Οι πολυμορφισμοί της CFTR πρωτεΐνης μπορεί να επηρεάζουν την έκφραση ή/και τη λειτουργία της και ομαδοποιούνται σε έξι κατηγορίες ανάλογα με την πρωταρχική βλάβη σε μοριακό επίπεδο. Οι ρυθμιστές διαύλων ιόντων είναι μικρές μοριακές ενώσεις που στοχεύουν στην αποκατάσταση της αρχικής βλάβης και κατ' επέκταση της μεταφοράς ιόντων χλωρίου διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης. Έχουν αναπτυχθεί κυρίως δύο κατηγορίες ρυθμιστών διαύλων ιόντων που στοχεύουν συγκεκριμένους τύπους μεταλλάξεων. Οι ενισχυτές (potentiators) στοχεύουν στην ελαττωματική ρύθμιση και αγωγιμότητα της CFTR πρωτεΐνης, ενώ οι επιδιορθωτές (correctors) στοχεύουν στην ελαττωματική επεξεργασία της πρωτεΐνης. Μόρια και των δύο κατηγοριών και συνδυασμός αυτών έχουν λάβει έγκριση ως θεραπευτικά μόρια σε ασθενείς που φέρουν συγκεκριμένους τύπους μεταλλάξεων. Ωστόσο, αυτά τα μόρια δεν καλύπτουν όλες τις ομάδες μεταλλάξεων και για αυτό το λόγο έχουν προταθεί εναλλακτικοί διάλυοι ιόντων, διαφορετικοί της CFTR πρωτεΐνης, ως θεραπευτικές επιλογές ανεξάρτητες από τον τύπο της μετάλλαξης. Επίσης, η γονιδιακή θεραπεία αποτελεί εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση στην ΚΙ και συνίσταται στη μεταφορά νουκλεϊκών οξέων που εκφράζουν τη CFTR πρωτεΐνη. Σε αυτήν την περίπτωση, ένα λειτουργικό αντίγραφο του CFTR γονιδίου μεταφέρεται στα κύτταρα από ιικούς ή μη-ιικούς φορείς με στόχο την αναπαραγωγή του και τη δημιουργία λειτουργικών αντιγράφων. Επιπλέον, η γονιδιακή τροποποίηση (genome editing) είναι μία νέα τεχνική που στοχεύει στη διόρθωση της γενετικής βλάβης σε επίπεδο DNA. Με τη γενετική τροποποίηση μπορούν να επιδιορθωθούν συγκεκριμένες μεταλλάξεις της CFTR ή να αποσιωπηθούν κωδικές αλληλουχίες γονιδίων που συνεισφέρουν στη νόσο, με την τεχνολογία CRISPR/Cas9 να θεωρείται ως η πιο αποτελεσματική. Τέλος, αναπτύσσονται νέοι αντιφλεγμονώδεις παράγοντες για τη βελτίωση της πνευμονικής λειτουργίας ασθενών με ΚΙ. Συμπερασματικά, οι θεραπευτικές λύσεις στην ΚΙ κατευθύνονται προς εξατομικευμένα μοντέλα, προσανατολισμένα στο γενετικό υπόβαθρο της νόσου.

## ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF) is one of the most common lethal genetic diseases. It appears with autosomal recessive inheritance pattern and it is caused by mutations in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) gene, which encodes an ion transport channel. In the present Master's thesis, the up-to-date bibliography is reviewed in order to present the new therapeutic approaches concerning the disease. CFTR polymorphisms can affect the expression and/or function of the CFTR protein and are categorized into different classes according to the primary molecular defect. Ion channel modulators are small-molecule compounds designed to restore the primary defect and thus enable the chloride transport through the cell membrane. Two classes of ion channel modulators have been developed in order to target specific types of mutations. Potentiator compounds target the defective regulation and gating of the CFTR protein, whereas corrector compounds target the defective processing of the CFTR protein. Compounds of both classes and combination of these compounds have been approved as therapeutic strategies for patients carrying specific types of CFTR mutations. However, these compounds are not suitable for every mutation class, thus alternative ion channels, other than the CFTR protein, have been proposed as potential therapeutic options irrespective of the mutation type. Moreover, gene therapy is a therapeutic approach that consists of the delivery of nucleic acids encoding the CFTR protein. In this case, a functional copy of the CFTR gene is delivered in the cells by viral or non-viral vectors in order to replicate and create functional copies. In addition, genome editing is a new technique that aims to repair the genetic defect at the DNA level. Through gene editing it is possible to repair specific CFTR mutations or silence coding sequences in genes that contribute to the disease; CRISPR/Cas9 is considered to be the most effective technique. Finally, new anti-inflammatory agents are developed in order to improve lung function in CF patients. To conclude, the therapeutic approaches in CF are heading towards personalized models, according to the genetic background of the disease.

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	1
ABSTRACT.....	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
1.1 Μοριακή βάση της ΚΙ.....	4
1.2 Επεξεργασία της CFTR .....	6
1.3 Κλινική εικόνα.....	7
1.4 Διάγνωση .....	10
1.5 Θεραπευτικές προσεγγίσεις στην ΚΙ.....	13
2. ΟΜΑΔΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΝΕΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ .....	16
2.1 Μεταλλάξεις ομάδας I και θεραπεία.....	18
2.2 Μεταλλάξεις ομάδας II και θεραπεία.....	19
2.3 Μεταλλάξεις ομάδας III και θεραπεία .....	23
2.4 Μεταλλάξεις ομάδας IV και θεραπεία .....	24
2.5 Μεταλλάξεις ομάδας V και θεραπεία .....	25
2.6 Μεταλλάξεις ομάδας VI και θεραπεία .....	26
3. ΔΙΑΥΛΟΙ ΙΟΝΤΩΝ ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ.....	28
3.1 Ρυθμιστές του επιθηλιακού διαύλου νατρίου.....	29
3.2 Ενεργοποιητές διαύλων χλωρίου.....	31
4. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ .....	34
4.1 Γονιδιακή θεραπεία με χρήση ιικών φορέων .....	34
4.2 Γονιδιακή θεραπεία με χρήση μη-ιικών φορέων .....	35
5. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ.....	37
6. ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ .....	40
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	41
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	44

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

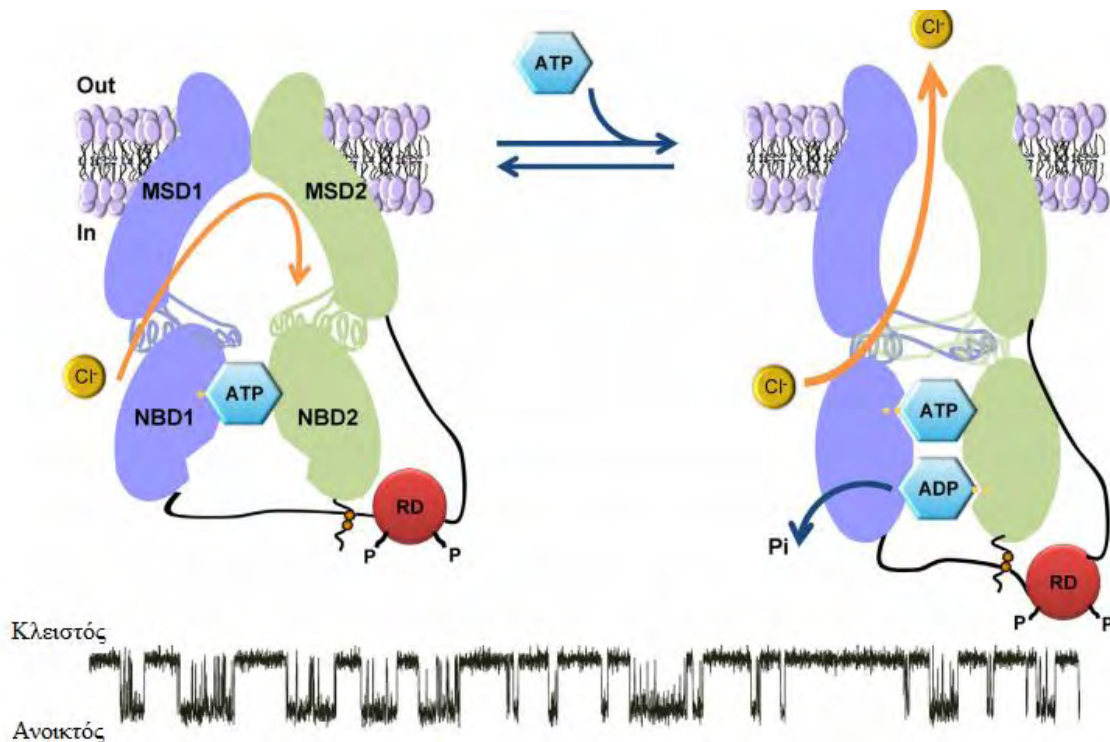
Η Κυστική Ίνωση (ΚΙ) αποτελεί μία από τις πιο κοινές θανατηφόρους γενετικές ασθένειες, η συχνότητα της οποίας ανέρχεται στο 1 στα 3500 νεογνά στον Καυκάσιο πληθυσμό. Ετησίως αναφέρονται περίπου 75000 περιπτώσεις ΚΙ παγκοσμίως, με την πλειοψηφία αυτών να έχει διαγνωσθεί σε βρεφική ηλικία. Οι νέες θεραπείες που εφαρμόζονται έχουν αυξήσει το προσδόκιμο ζωής, ενώ σύμφωνα με επιδημιολογικά δεδομένα φαίνεται ότι η μέση ηλικία ζωής για παιδιά που γεννήθηκαν το 2010 με ΚΙ ήταν τα 37-40 έτη. Πρόκειται για μία πάθηση που παρουσιάζει αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας και οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR), το οποίο κωδικοποιεί ένα κανάλι μεταφοράς ιόντων. Υπολογίζεται ότι το 1% του πληθυσμού παγκοσμίως είναι φορείς ενός μεταλλαγμένου αλληλομόρφου.<sup>(1)</sup>

### 1.1 Μοριακή βάση της ΚΙ

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CFTR έχει μέγεθος 250kb και εδράζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 7 και συγκεκριμένα στην περιοχή 7q31.2. Η πρωτεΐνη CFTR ανήκει στην ομάδα των ABC διαμεμβρανικών πρωτεϊνών-μεταφορέων (ATP binding cassette transporters family) και δρα ως ένας διάυλος ιόντων χλωρίου. Εντοπίζεται στο πάνω μέρος της μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων, ενώ επίσης μπορεί να βρεθεί τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και σε διαμεμβρανικές περιοχές. Όσον αφορά τη δομή της CFTR, αυτή αποτελείται από διακριτές δομικές περιοχές οι οποίες επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο τη σταθερότητα και τη λειτουργικότητα της CFTR.<sup>(2)</sup> Συγκεκριμένα, η CFTR φέρει δύο υδρόφοβες διαμεμβρανικές περιοχές (MSD1 και MSD2), που αποτελούνται από 6 διαμεμβρανικές α-έλικες (M1 έως M6) και δύο κυτοσολικές θηλιές (ICLs) η καθεμία, δύο περιοχές πρόσδεσης νουκλεοτιδίου (NBD1 και NBD2) και μια ρυθμιστική περιοχή R (Εικόνα 1). Η περιοχή R περιέχει πολλές θέσεις φωσφορυλίωσης, οι οποίες επιτρέπουν την φωσφορυλίωσή της από τις πρωτεϊνικές κινάσες A (PKA), C (PKC) και 2 (CK2), συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο σημαντικά στη λειτουργία και ρύθμιση της CFTR πρωτεΐνης. Η δράση της περιοχής R εξαρτάται από την παρουσία του ενδοκυττάρου ATP, το οποίο συνδέεται και υδρολύεται στις NBD περιοχές, έχοντας ως αποτέλεσμα το διμερισμό των περιοχών R και το άνοιγμα του διαύλου. Η πρωτεΐνη CFTR εκφράζεται στο επιθήλιο πολλών εξωκρινών ιστών όπως των αεραγωγών, του πνεύμονα, του παγκρέατος, του ήπατος, του εντέρου, των σπερματικών πόρων και των ιδρωτοποιών αδένων, όπου λειτουργεί ως

διάλυος ιόντων χλωρίου. Η μετακίνηση των ιόντων χλωρίου συνεισφέρει στην ενυδάτωση την βλέννης των αεραγωγών. Επίσης, έχει τη δυνατότητα μεταφοράς διττανθρακικών και γλουταθειόνης, ενώ παίζει ρόλο στη ρύθμιση της δραστηριότητας άλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένου του επιθηλιακού διαύλου ιόντων νατρίου (ENaC), ο οποίος δεν έχει τη δυνατότητα να απορροφήσει άλατα στις μεταλλαγμένες μορφές της CFTR.<sup>(3)</sup>

Το φυσιολογικό αναπνευστικό επιθήλιο καλύπτεται από ένα λεπτό στρώμα υγρού, το υγρό της επιφάνειας των αεραγωγών (airway surface liquid, ASL), πάνω στο οποίο επικάθεται το στρώμα βλέννης που εκκρίνεται από τα κύτταρα goblet και Clara. Η βλέννη παγιδεύει τους μικροοργανισμούς, οι οποίοι απομακρύνονται μέσω του μηχανισμού της βλεννοκροσσωτής κάθαρσης (mucociliary clearance, MCC). Οι εκκρίσεις γύρω από τους κροσσούς ρυθμίζονται από την απορρόφηση νατρίου μέσω του επιθηλιακού διαύλου νατρίου της κορυφαίας μεμβράνης (ENaC), καθώς και από την έκκριση χλωρίου μέσω του CFTR διαύλου. Μεταλλάξεις στο CFTR αλλάζουν τη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα οι διάλυοι να γίνονται μη διαπερατοί στα ιόντα χλωρίου ως απάντηση στην αύξηση του cAMP των επιθηλιακών κυττάρων. Διαταραχές στην έκφραση, διακίνηση ή λειτουργία της CFTR οδηγούν σε μειωμένη έκκριση των ιόντων χλωρίου και αυξημένη απορρόφηση ιόντων νατρίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του υγρού της επιφάνειας των αεραγωγών και κατ' επέκταση τη μειωμένη κάθαρση της βλέννης. Τα παραπάνω ευνοούν το βακτηριακό αποικισμό των αεραγωγών, τις επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, τη χρόνια φλεγμονή και τη μη αντιστρεπτή καταστροφή του αναπνευστικού επιθηλίου.<sup>(4)</sup>



**Εικόνα 1.** Η δομή του πόρου CFTR. Η ATP προκαλεί αλλαγές στη στερεοδιάταξη του πόρου, εναλλάσσοντάς τον μεταξύ μιας «κλειστής» και μιας «ανοικτής» διαμόρφωσης, αποτρέποντας και επιτρέποντας αντίστοιχα τη διέλευση ιόντων χλωρίου δια μέσου αυτού. Συντομογραφίες: MSD (membrane-spanning domain), επικράτεια που εκτείνεται στην πλασματική μεμβράνη, NBD (nucleotide-binding domain), επικράτεια πρόσδεσης νουκλεοτιδίου, RD (regulatory domain), ρυθμιστική επικράτεια. Επεξεργασμένο από Hwang & Sheppard, *The Journal of Physiology*, 2009. <sup>(5)</sup>

## 1.2 Επεξεργασία της CFTR

Η βιοσύνθεση και μεταφορά της CFTR περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα διαδικασιών, ενώ αρκετοί μηχανισμοί ελέγχου ρυθμίζουν την αναδίπλωση της πρωτεΐνης, τη σταθερότητα και τη μεταφορά της στην πλασματική μεμβράνη. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα της CFTR που προκύπτει από το ριβόσωμα, εισάγεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) μέσω διαδοχικών και συντονισμένων ενεργειών σηματοδότησης μέσω της θέσης μετατόπισης. Μετά την εισαγωγή στο ΕΔ, η νεοσυντιθέμενη CFTR πρωτεΐνη εξέρχεται στον αυλό του ΕΔ, όπου η γλυκοζυλίωση παίζει καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία ελέγχου της ποιότητας που περιλαμβάνει την αναδίπλωση των πρωτεϊνών που προορίζονται για το εκκριτικό μονοπάτι. Μελέτες ηλεκτροφόρησης σε gel αναγνώρισαν τρεις μορφές της CFTR: μία πλήρως γλυκοζυλιωμένη μορφή (ώριμη), μία N-γλυκοζυλιωμένη μορφή και μία μη γλυκοζυλιωμένη μορφή. Η ρύθμιση της μεταφοράς, του σωστού προσανατολισμού και της διατήρησης της θέσης της στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων είναι μια σύνθετη διαδικασία. Πολλά μέλη της οικογένειας των Ras πρωτεϊνών, όπως οι Rab και Rho ομάδες, εμπλέκονται στη ρύθμιση των τελευταίων σταδίων της μεταφοράς της πρωτεΐνης στην πλασματική μεμβράνη. 10% της CFTR της πλασματικής μεμβράνης επανεισέρχεται στο κύτταρο κάθε λεπτό μέσω



ενδοκυττάρωσης με κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη και στη συνέχεια ανακυκλώνεται και μεταφέρεται εκ νέου στην κυτταρική επιφάνεια με μεγάλη αποτελεσματικότητα.<sup>(4)</sup>

### 1.3 Κλινική εικόνα

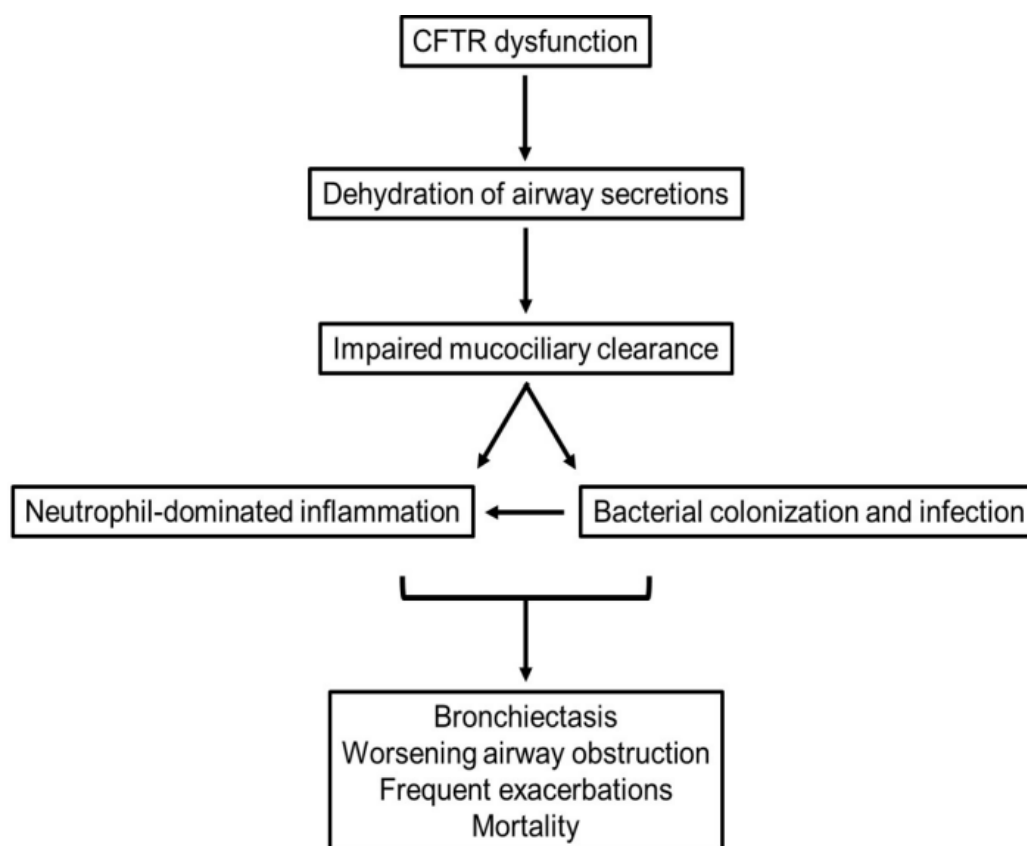
Πληθώρα μελετών έχει δείξει ότι διαταραχές στη CFTR πρωτεΐνη έχουν συσχετιστεί με διακριτούς κλινικούς φαινοτύπους της ΚΙ, οι οποίοι είναι χαρακτηριστικοί για κάθε όργανο που επηρεάζεται. Τα συστήματα που επηρεάζονται από τη CFTR περιέχουν εκκριτικά επιθήλια, όπου η CFTR ενέχεται στη ρύθμιση της ομοιόστασης των ιόντων και του pH. Οι αεραγωγοί, το έντερο, το πάγκρεας, το ηπατοχοληφόρο σύστημα, οι υποβλεννογόνιοι αδένες των αεραγωγών και οι ιδρωτοποιοί αδένες χρειάζονται λειτουργική CFTR ώστε να εξασφαλιστεί η φυσιολογική λειτουργία τους. Διαταραχές στην έκφραση ή/και στη λειτουργία της CFTR επηρεάζουν διαφορετικά τους ιστούς, με αποτέλεσμα οι πάσχοντες να παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια όσον αφορά τα συμπτώματα της νόσου, τη βαρύτητα αυτών, αλλά και το ρυθμό εξέλιξης της ΚΙ. Μελέτες αναφέρουν ότι η φαινοτυπική ετερογένεια που χαρακτηρίζει την ΚΙ οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου της CFTR, σε περιβαλλοντικούς παράγοντες αλλά και σε τροποποιητικά γονίδια.<sup>(6)</sup>

#### 1.3.1 Αναπνευστικό σύστημα

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, μειωμένη έκφραση ή/και απουσία λειτουργικής CFTR πρωτεΐνης έχει συσχετιστεί με διαταραχές της φλεγμονώδους απόκρισης. Συγκεκριμένα, παρατηρείται απορρύθμιση της φυσικής και επίκτητης ανοσίας, ανωμαλίες της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων, ενώ σε μοριακό επίπεδο παρατηρούνται διαταραχές στην κυτταρική σηματοδότηση μεταγραφικών παραγόντων που ενέχονται σε φλεγμονώδη σηματοδοτικά μονοπάτια όπως οι υποδοχείς TLRs (Toll-like receptors).

Οι πνεύμονες των πασχόντων χαρακτηρίζονται από οξεία φλεγμονή στην οποία σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα ουδετερόφιλα, τα οποία απελευθερώνουν οξειδωτικά μόρια και πρωτεάσες. Λόγω της δράσης των τελευταίων, οι ασθενείς παρουσιάζουν βρογχεκτασία που σχετίζεται με επιδείνωση της πνευμονικής λειτουργίας και παροξύνσεις. Επιπλέον, η έλλειψη λειτουργικής CFTR οδηγεί σε ελαττωματική έκκριση ιόντων χλωρίου και διττανθρακικών στους αεραγωγούς, με αποτέλεσμα οι βλεννίνες να συγκεντρώνονται στη βρογχική επιφάνεια και να ελαττώνεται το pH του υγρού της επιφάνειας των αεραγωγών.<sup>(7)</sup> Με αυτόν τον τρόπο, η παχύρρευστη βλέννη αποφράσσει τον αυλό, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση μικροβίων και την ανάπτυξη υποτροπιάζουσών λοιμώξεων του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, κυρίως από *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza* και *Pseudomonas aeruginosa*

(Εικόνα 2). Στις κλινικές εκδηλώσεις του αναπνευστικού συστήματος σε ασθενείς με ΚΙ περιλαμβάνονται επίσης ο χρόνιος βήχας, η δύσπνοια, η πληκτροδακτυλία, η χρόνια παραρρινοκολπίτιδα, οι ρινοικοί πολύποδες, οι αιμοπτύσεις και ο πνευμοθώρακας.<sup>(8)</sup>



**Εικόνα 2.** Η γενετική βλάβη στο γονίδιο της ΚΙ οδηγεί σε κύκλους φλεγμονής και λοίμωξης. Ελαττωματική μεταφορά ιόντων χλωρίου διαμέσου της CFTR οδηγεί σε αφυδάτωση της επιφάνειας του αεραγωγού, ελαττωματική βλεννοκροσσωτή κάθαρση, βλεννόσταση, φλεγμονή και απόφραξη του αεραγωγού, παρέχοντας στα παθογόνα το ιδανικό περιβάλλον για αύξηση και αποικισμό. Όταν συνυπάρχει δυσλειτουργία των μηχανισμών άμυνας, παρατηρούνται επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις και φλεγμονή του αεραγωγού, που συνοδεύονται από επιδείνωση της πνευμονικής λειτουργίας, συχνούς παροξυσμούς και πρόωμη θνητότητα. Επεξεργασμένο από McElvaney et al., *Expert Review of Respiratory Medicine*, 2018.<sup>(9)</sup>

### 1.3.2 Γαστρεντερικό σύστημα

Οι κύριες εκδηλώσεις από το γαστρεντερικό οφείλονται στην παγκρεατική ανεπάρκεια λόγω απόφραξης του παγκρεατικού πόρου και ανεπάρκειας των παγκρεατικών ενζύμων (αμυλάση, λιπάση, πρωτεάσες) και αφορούν το 90% των ασθενών με ΚΙ. Η παγκρεατική ανεπάρκεια κλινικά εκδηλώνεται με συχνές, ογκώδεις, δύσοσμες και λιπαρές κενώσεις (στεατόρροια), που έχουν ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της σωματικής αύξησης. Επιπλέον, διαταραχές της εξωκρινούς λειτουργίας του παγκρέατος αποτελούν η δυσαπορρόφηση θρεπτικών

συστατικών και η ανεπάρκεια λιποδιαλυτών βιταμινών (A, D, E, K) η οποία φαίνεται να οδηγεί σε οίδημα και σοβαρής μορφής υποπρωτεϊναιμία.<sup>(8)</sup>

Σημαντική επιπλοκή της οφειλόμενης στην ΚΙ παγκρεατικής ανεπάρκειας είναι και ο διαβήτης που σχετίζεται με την ΚΙ (Cystic Fibrosis Related Diabetes, CFRD). Σε αυτές τις περιπτώσεις, παρατηρείται προοδευτική μείωση στην έκκριση της ινσουλίνης και του αριθμού των παγκρεατικών β-κυττάρων, η οποία είναι ηλικιοεξαρτώμενη. Πιο συγκεκριμένα, ενώ η βασική έκκριση της ινσουλίνης διατηρείται, μείωση παρατηρείται στην απόκριση της ινσουλίνης μετά από φόρτιση με γλυκόζη με αποτέλεσμα να παρατηρείται μεταγευματική υπεργλυκαιμία. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι τα επίπεδα της γλυκόζης είναι χαμηλότερα πριν το πρωινό και αυξάνονται μετά από κάθε γεύμα, με τα μέγιστα επίπεδα αυτής να παρατηρούνται μετά το βραδινό γεύμα. Η καθυστέρηση στην έκκριση ινσουλίνης οδηγεί σε υπογλυκαιμία 1-2 ώρες μετά το γεύμα.<sup>(10)</sup>

Η CFTR εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη των χοληφόρων επιθηλιακών κυττάρων ή των χολαγγειοκυττάρων και η απώλεια της λειτουργικότητάς της οδηγεί σε ελαττωμένη σύνθεση και έκκριση χολής. Η χολή κατακρατείται στο χοληφόρο δέντρο και προκαλεί φλεγμονή και ίνωση λόγω ενεργοποίησης των ηπατικών Ito κυττάρων, ενώ η εστιακή χολική ίνωση μπορεί να εξελιχθεί σε κίρρωση.<sup>(11)</sup>

Διαταραχές λόγω της ΚΙ που δε σχετίζονται με τη λειτουργία της CFTR στα χοληφόρα μπορούν επίσης να επηρεάσουν την ηπατική λειτουργία. Ο μεταβολισμός των φωσφολιπιδίων και ο διαβήτης που σχετίζεται με την ΚΙ μπορούν να μειώσουν το μεταβολισμό των λιπιδίων και της γλυκόζης και να προκαλέσουν ηπατική στεάτωση.<sup>(11)</sup>

Η διάγνωση της ηπατικής νόσου που σχετίζεται με την ΚΙ (Cystic Fibrosis Related Liver Disease, CFLD) περιλαμβάνει την κλινική εξέταση του ασθενούς καθώς επίσης και τον έλεγχο δεικτών που είναι χαρακτηριστικοί της ηπατικής λειτουργίας. Επιπλέον, βασίζεται και σε υπερηχογραφικά ευρήματα, ενώ η βιοψία του ήπατος χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση της διάγνωσης.<sup>(12)</sup>

Το σύνδρομο περιφερικής εντερικής απόφραξης (Distal Intestinal Obstruction Syndrome, DIOS) είναι το αποτέλεσμα συνάθροισης παχύρρευστου κολλώδους υλικού στον εντερικό σωλήνα, τόσο στο βλεννογόνο όσο και στα κόπρανα, και κυρίως στον τελικό ειλεό και στο τυφλό. Η συσσωρευμένη μάζα προσκολλάται στο εντερικό τοίχωμα όπου οι εντερικές λάχνες δυσκολεύουν την απομάκρυνσή της και οδηγούν σε εντερική απόφραξη.<sup>(13)</sup>

Ο ειλεός από μηκόνιο αποτελεί συχνά την πρώτη εκδήλωση της ΚΙ και συναντάται σε περίπου 20% των ασθενών με ΚΙ. Ο ειλεός φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της διαταραγμένης έκκρισης  $\text{HCO}_3^-$  η οποία μειώνει το pH του εντερικού αυλού και κατ' επέκταση δημιουργεί ένα όξινο και αφυδατωμένο περιβάλλον που οδηγεί σε παχύρρευστη βλέννη. Στην απλή

μορφή του ειλεού από μηκώνιο, το παχύρρευστο μηκώνιο αποφράσσει τον τελικό ειλεό και το λεπτό έντερο κοντά στην απόφραξη διατείνεται. Στη σύνθετη μορφή, τα διατεταμένα τμήματα του εντέρου μπορούν να επιφέρουν σημαντικές επιπλοκές όπως η προγεννητική συστροφή, η ισχαιμική νέκρωση, η εντερική ατρησία, η διάτρηση και διαφυγή του μηκώνιου στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Η διάγνωση προγεννητικά γίνεται με υπερηχογραφικά ευρήματα υπερηχογενούς εντέρου ή περιτοναϊκών επασβεστώσεων.<sup>(14)</sup>

### **1.3.3 Αναπαραγωγικό σύστημα**

Μελέτες έχουν δείξει ότι συχνή επιπλοκή της ΚΙ σε άρρενες πάσχοντες είναι η υπογονιμότητα, δεδομένου ότι πάνω από το 95% των ανδρών με ΚΙ παρουσιάζουν αζωοσπερμία. Η αζωοσπερμία που παρατηρείται στην ΚΙ προκαλείται από ανωμαλίες των σπερματοδόχων κύστεων μονόπλευρα ή αμφοτερόπλευρα, καθώς επίσης και των σπερματικών πόρων όπου παρατηρείται απλασία, υποπλασία ή/και ίνωση. Η συγγενής απουσία σπερματικών πόρων (Congenital absence of the vas deferens, CAVD) συνήθως ανευρίσκεται κατά τη διάρκεια διερεύνησης υπογονιμότητας ή ως τυχαίο εύρημα κατά τη διάρκεια χειρουργικών επεμβάσεων.<sup>(15)</sup>

### **1.3.4 Λοιπές εκδηλώσεις**

Χαρακτηριστικό κλινικό εύρημα της ΚΙ είναι η αυξημένη συγκέντρωση νατρίου και χλωρίου στον ιδρώτα των ασθενών εξαιτίας της αδυναμίας των πόρων των ιδρωτοποιών αδένων να επαναρροφήσουν τα άλατα. Η παραπάνω επιπλοκή έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο υπότονης αφυδάτωσης σε περιπτώσεις αυξημένης εφίδρωσης μετά από θερμικό στρες, όπως σε πυρετό, σωματική άσκηση, ή υψηλές θερμοκρασίες.<sup>(8)</sup>

## **1.4 Διάγνωση**

Το ενδεχόμενο ύπαρξης της ινοκυστικής νόσου πρέπει να εξετάζεται σοβαρά σε κάθε περίπτωση ασθενούς με χρόνια ή υποτροπιάζοντα αναπνευστικά ή γαστρεντερικά συμπτώματα. Η διάγνωση της ΚΙ πραγματοποιείται σύμφωνα με διαγνωστικά κριτήρια που ορίστηκαν το 2008 από την Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. Προκειμένου να τεθεί η διάγνωση της ΚΙ θα πρέπει να υπάρχουν ευρήματα που υποδηλώνουν χρόνια νόσο του αναπνευστικού συστήματος, διατροφικές και γαστρεντερικές ανωμαλίες, ανεπάρκεια της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος, καθώς και διαταραχές του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει το θετικό οικογενειακό ιστορικό

καθώς και εργαστηριακές ενδείξεις οι οποίες υποδεικνύουν δυσλειτουργία της CFTR πρωτεΐνης. Η τελευταία επιβεβαιώνεται είτε από την παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης χλωρίου στον ιδρώτα των νεογνών είτε από την ύπαρξη μεταλλάξεων στο γονίδιο της ΚΙ.<sup>(16)</sup> Συγκεκριμένα, μέχρι και σήμερα κατάλληλο διαγνωστικό εργαλείο αποτελεί το τεστ ιδρώτα με ιοντοφόρηση πιλοκαρπίνης κατά το οποίο η συγκέντρωση του χλωρίου θα πρέπει να υπερβαίνει τα 60mEq/L σε δυο ξεχωριστές μετρήσεις στις οποίες έχει συγκεντρωθεί επαρκής ποσότητα ιδρώτα, ώστε να τεθεί η διάγνωση της ΚΙ (Πίνακας 1).<sup>(16)</sup>

**Πίνακας 1.** Επίπεδα συγκέντρωσης χλωρίου στον ιδρώτα και ερμηνεία των τιμών ανά ηλικιακή ομάδα. Επεξεργασμένο από Paranjape & Mogaayzel, *Pediatrics in Review*, 2014.<sup>(16)</sup>

Ηλικιακή Ομάδα	Συγκέντρωση χλωρίου στον ιδρώτα (mEq/L)	Ερμηνεία
Νεογνά/Βρέφη 0-6 μηνών	0-29	ΚΙ όχι πολύ πιθανή*
	30-59	Ενδιάμεση πιθανότητα για ΚΙ
	≥60	Ενδεικτικό για ΚΙ
	0-39	ΚΙ όχι πολύ πιθανή*
Βρέφη >6 μηνών, παιδιά, ενήλικες	40-59	Ενδιάμεση πιθανότητα για ΚΙ
	≥60	Ενδεικτικό για ΚΙ
	*Υπάρχουν άτομα με ΚΙ με επίπεδα χλωρίου στον ιδρώτα σε αυτό το εύρος τιμών	

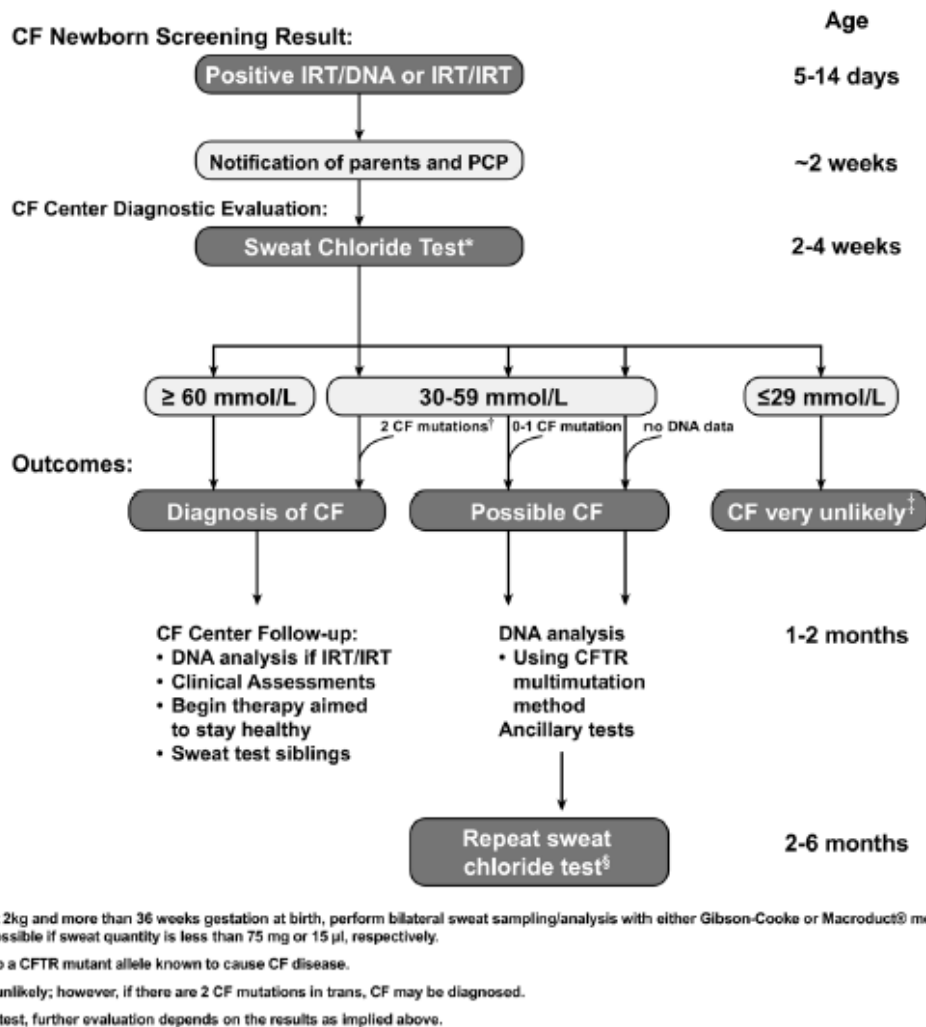
Επιπλέον, η ύπαρξη ινοκυστικής νόσου επιβεβαιώνεται και σε μοριακό επίπεδο, όπου με τη χρήση κατάλληλων υλικών διερευνάται η παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο CFTR, οι οποίες οδηγούν σε διαταραγμένη λειτουργία της παραγόμενης πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, η διάγνωση τίθεται όταν εντοπίζονται δύο ή περισσότερες νοσογόνες μεταλλάξεις στο γονίδιο CFTR οι οποίες βρίσκονται σε θέση *trans* σε δύο ξεχωριστά χρωμοσώματα. Όταν οι μεταλλάξεις βρίσκονται σε θέση *cis* στο ίδιο χρωμόσωμα δεν εκδηλώνεται η νόσος.<sup>(16)</sup>

Παρά τα πιθανά πλεονεκτήματα από τη γονοτύπιση ατόμων με ΚΙ, οι συνέπειες της πλειοψηφίας των μεταλλάξεων της CFTR παραμένουν άγνωστες, καθώς μία μετάλλαξη αντιπροσωπεύει απλά μία αλλαγή της αλληλουχίας του γονιδίου και των ρυθμιστικών του στοιχείων που θεωρείται φυσιολογική. Για να θεωρηθεί μία μετάλλαξη η αιτία της ΚΙ θα πρέπει: (1) να προκαλεί αλλαγή στην αλληλουχία των αμινοξέων που επηρεάζουν σημαντικά

τη σύνθεση και λειτουργία της CFTR, (2) να εισάγει ένα πρόωρο σήμα τερματισμού, (3) να μεταβάλλονται οι θέσεις ματίσματος ιντρονίων, ή (4) να εισάγει μια καινούρια αλληλουχία αμινοξέων που δεν εμφανίζεται στα φυσιολογικά γονίδια της CFTR τουλάχιστον 100 φορές μεταλλάξεων ΚΙ της ίδιας πληθυσμιακής ομάδας.<sup>(17)</sup>

Οι μετρήσεις της ρινικής διαφοράς δυναμικού μπορούν να βοηθήσουν στη διάγνωση της ΚΙ, ειδικά σε μη τυπικές περιπτώσεις, αλλά δεν αποτελούν πρότυπη διαγνωστική μέθοδο και λαμβάνουν χώρα σε περιορισμένα κέντρα αναφοράς ΚΙ. Διαταραχές της λειτουργίας της CFTR πρωτεΐνης επιφέρουν ανωμαλίες στη μετακίνηση ιόντων και κατ' επέκταση στη συγκέντρωση αλάτων στο υγρό που καλύπτει την επιφάνεια των ρινικών οδών. Η μετακίνηση των ιόντων δημιουργεί ηλεκτρική διαφορά δυναμικού, η οποία μπορεί να μετρηθεί με την τοποθέτηση ηλεκτροδίων στο ρινικό επιθήλιο. Στους ασθενείς με ΚΙ, η ρινική επιθηλιακή διαφορά δυναμικού ανταποκρίνεται διαφορετικά στην χορήγηση αλατούχων διαλυμάτων στο ρινικό επιθήλιο.<sup>(16)</sup>

Το screening των νεογνών για ΚΙ περιλαμβάνει τη μέτρηση της ποσότητας του ανοσοαντιδραστικού θρυψινογόνου (immunoreactive trypsinogen, IRT) από δείγμα αίματος που λαμβάνεται από την πτέρνα του νεογνού. Το αποτέλεσμα θεωρείται θετικό όταν τα επίπεδα του IRT παραμένουν αυξημένα στις πρώτες 7 έως 14 ημέρες ζωής του νεογνού ή εάν έχει βρεθεί τουλάχιστον μία μετάλλαξη στο CFTR, οπότε θα πρέπει να διενεργηθεί το τεστ ιδρώτα (Εικόνα 3).<sup>(18)</sup>



**Εικόνα 3.** Αλγόριθμος για τη διάγνωση της ΚΙ με βάση τα στοιχεία που προκύπτουν από το screening των νεογνών. Επεξεργασμένο από Ferrell et al., *The Journal of Pediatrics*, 2008. <sup>(17)</sup>

## 1.5 Θεραπευτικές προσεγγίσεις στην ΚΙ

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κάποια θεραπεία για την αντιμετώπιση της ΚΙ. Παρόλα αυτά, οι θεραπευτικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται στοχεύουν στη βελτίωση της κλινικής εικόνας του ασθενούς καθώς και στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης περαιτέρω επιπλοκών. Γενικότερα, οι θεραπείες που εφαρμόζονται αποσκοπούν στη βελτιστοποίηση της πνευμονικής λειτουργίας, της διατροφικής πρόσληψης καθώς επίσης στόχος είναι η σωματική αύξηση ανάλογη της ηλικίας. Η θεραπεία της νόσου πραγματοποιείται δια βίου και αρχίζει με τη διάγνωση της πάθησης. <sup>(18)</sup>

### 1.5.1 Παροχέτευση των αεραγωγών

Για τη θεραπεία της πνευμονικής νόσου στην ΚΙ, οι τεχνικές παροχέτευσης των αεραγωγών διευκολύνουν την αναπνοή των ασθενών βελτιώνοντας με αυτόν τρόπο την ποιότητα ζωής

τους. Συγκεκριμένα, απομακρύνονται οι πλεονάζουσες βρογχικές εκκρίσεις, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο κίνδυνος ανάπτυξης λοιμώξεων του αναπνευστικού και κατ' επέκταση να βελτιώνεται η λειτουργία των πνευμόνων. Οι συνήθεις τακτικές φυσιοθεραπείας του αναπνευστικού περιλαμβάνουν τη στάση πλήξης και παροχέτευσης, τον ενεργητικό κύκλο αναπνοής, την αυτογενή παροχέτευση, τη θετική εκπνευστική πίεση, τη θετική εκπνευστική πίεση με ταλάντωση, και την άσκηση. Οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με εισπνεόμενα που αλλάζουν τη σύσταση της βλέννης των αεραγωγών και διευκολύνουν την απομάκρυνσή της, καθώς περιλαμβάνουν ανασυνδυασμένες ανθρώπινες DNAάσες (Dornase alfa) και υπέρτονα διαλύματα. Οι τεχνικές αυτές συνήθως εφαρμόζονται δύο φορές ημερησίως ως θεραπεία συντήρησης και η συχνότητά τους προσαρμόζεται σε περιόδους οξείας πνευμονικής νόσου και παροξύνσεων.<sup>(16)</sup>

### 1.5.2 Λοιμώξεις του αναπνευστικού

Η αντιμετώπιση των αναπνευστικών λοιμώξεων σε ασθενείς με ΚΙ κρίνεται επιτακτικής ανάγκης καθώς επηρεάζουν την πνευμονική λειτουργία. Μελέτες έχουν δείξει ότι το κυριότερο παθογόνο σε ασθενείς με ΚΙ αποτελεί η *Pseudomonas aeruginosa*. Η θεραπεία της ψευδομονάδας ως πρωταρχική λοίμωξη περιλαμβάνει εισπνεόμενη τομπραμυκίνη, με στόχο την εξάλειψή της.<sup>(16)</sup>

Επεισόδια πνευμονικών παροξύνσεων αντιμετωπίζονται με χρήση αντιβιοτικών και αυξημένη παροχέτευση των εκκρίσεων του αναπνευστικού. Στις λοιμώξεις με *S.aureus* και *H.influenza* συνήθως χρησιμοποιούνται αντιβιοτικά από του στόματος, ενώ διαφορετική προσέγγιση ακολουθείται σε περιπτώσεις χρόνιας λοίμωξης από *P.aeruginosa* ή άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια. Συγκεκριμένα απαιτείται ενδοφλέβια χορήγηση αντιβιοτικών διάρκειας 14 ημερών, όπως πενικιλίνη μακράς δράσης, κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς ή καρβαπενέμες, σε συνδυασμό με αμινογλυκοσίδες ή πολυμυξίνες. Σε περιπτώσεις εμμένουσας λοίμωξης ή επιδείνωσης, χορηγούνται επιπλέον διατροφικά συμπληρώματα, ενώ επίσης πραγματοποιείται παροχή οξυγόνου ή μη επεμβατικός μηχανικός αερισμός.<sup>(18)</sup>

### 1.5.3 Θεραπεία υποκατάστασης παγκρεατικών ενζύμων

Με τη διάγνωση της ΚΙ, χορηγείται άμεσα θεραπεία υποκατάστασης των παγκρεατικών ενζύμων με σκοπό τη διατήρηση της φυσιολογικής ανάπτυξης. Απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχία της θεραπείας, είναι η χορήγηση αυτής λαμβάνοντας υπ' όψιν το λίπος που προσλαμβάνεται με το κάθε γεύμα ώστε να χορηγηθεί η σωστή ποσότητα ενζύμων.



Η συγκεκριμένη θεραπευτική προσέγγιση περιλαμβάνει τη χορήγηση πολλαπλών εξωγενών παγκρεατικών ενζύμων και ειδικά λιπάσης, αμυλάσης και πρωτεάσης στον αυλό του δωδεκαδακτύλου ώστε να διευκολυνθεί η πέψη λιπών και πρωτεϊνών. Αποτέλεσμα της παραπάνω θεραπείας είναι η βελτίωση της εξωκρινούς παγκρεατικής ανεπάρκειας, η οποία εκτιμάται κυρίως από την παγκρεατική ελαστάση-1 στα κόπρανα ως screening τεστ. Οι ασθενείς με παγκρεατική ανεπάρκεια πρέπει να λαμβάνουν δια βίου θεραπεία υποκατάστασης με παγκρεατικά ένζυμα σε κάθε γεύμα. Η σωστή χορήγηση της θεραπείας μειώνει σημαντικά την απέκκριση λιπών στα κόπρανα και τη στεατόρροια, με αποτέλεσμα οι ασθενείς με ΚΙ να έχουν αύξηση ανάλογη της ηλικίας τους και να αυξήσουν το βάρος σώματος.<sup>(19)</sup>

#### **1.5.4 Μεταμόσχευση Πνευμόνων**

Οι προοδευτικές επιπτώσεις της λοίμωξης και της φλεγμονής των αεραγωγών οδηγούν σε εκτεταμένες βρογχεκτασίες και αποφρακτική βρογχίτιδα, που έχουν ως αποτέλεσμα την αναπνευστική ανεπάρκεια. Σε προχωρημένη αναπνευστική ανεπάρκεια, η μεταμόσχευση πνευμόνων αποτελεί μονόδρομο για τη θεραπεία των ασθενών. Συγκεκριμένα, ο πάσχων θα πρέπει να πληροί κάποια κριτήρια που θα υποδείξουν αναγκαία τη μεταμόσχευση πνευμόνων. Συγκεκριμένα, τα κριτήρια για μεταμόσχευση πνευμόνων περιλαμβάνουν α) FEV<sub>1</sub> (Forced Expiratory Volume in the first second) μικρότερο από 30%, β) παρόξυνση πνευμονικής νόσου που απαιτεί παραμονή σε μονάδα εντατικής θεραπείας, γ) αυξημένη συχνότητα παροξύνσεων με αντιβιοτική αγωγή, δ) κλειστό ή επαναλαμβανόμενο πνευμοθώρακα και ε) επαναλαμβανόμενα επεισόδια αιμόπτυσης που δεν αντιμετωπίζονται με εμβολισμό.<sup>(20)</sup>

## 2. ΟΜΑΔΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΝΕΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

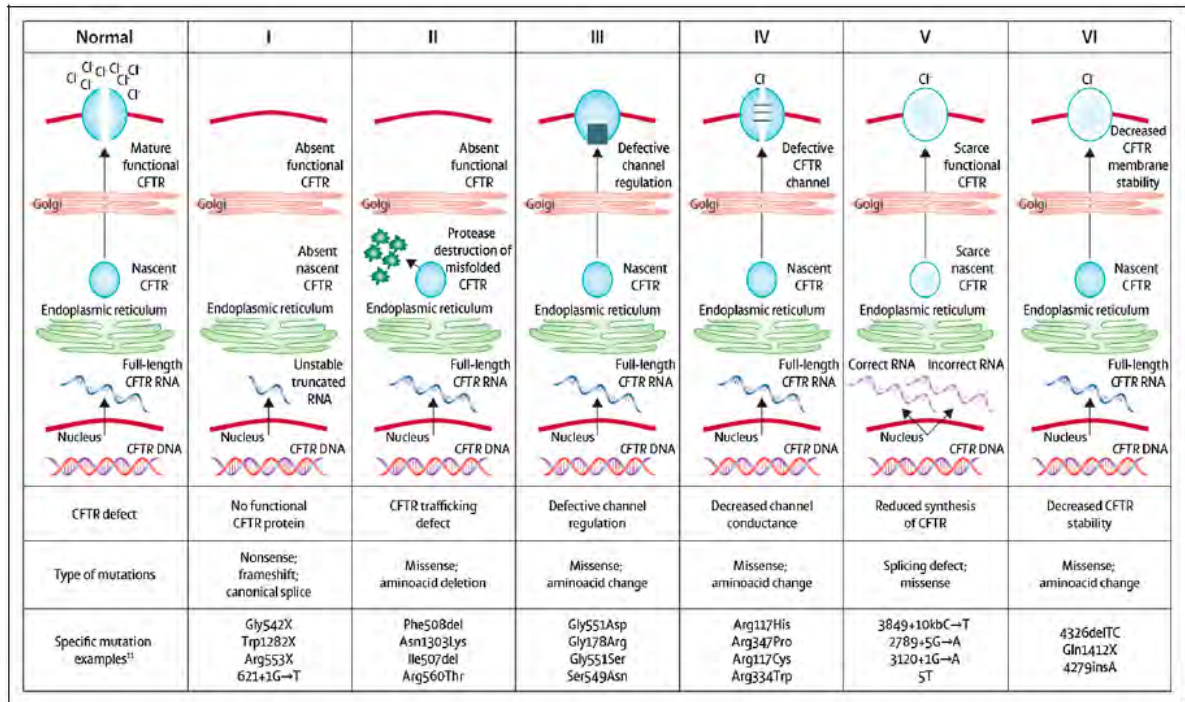
Υπάρχουν διάφοροι τύποι μεταλλάξεων της πρωτεΐνης CFTR. Έχουν καταχωρηθεί σχεδόν 2000 πολυμορφισμοί στη Cystic Fibrosis Mutation Database. Από αυτούς, το 40% αφορά αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου, το 36% ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις, μεταλλάξεις αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης και μη φυσιολογικού ματίσματος, το 3% περιλαμβάνει μεγάλες αναδιατάξεις, το 1% επηρεάζει την περιοχή του υποκινητή, το 14% αποτελεί ουδέτερες παραλλαγές, ενώ το υπόλοιπο 6% παραμένει άγνωστο. Οι πολυμορφισμοί που προκαλούν την ασθένεια μπορεί να επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης ή/και τη λειτουργία της πρωτεΐνης CFTR στην κυτταρική μεμβράνη. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της ΚΙ ταξινομούνται σε έξι κατηγορίες ανάλογα με την πρωταρχική βλάβη σε κυτταρικό επίπεδο, ωστόσο η κατηγοριοποίηση δεν είναι πάντα εύκολη, καθώς μία μετάλλαξη μπορεί να επηρεάσει πολλαπλές κυτταρικές διεργασίες (Εικόνα 4). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μετάλλαξη ΔF508del, η οποία αποτελεί την πιο συχνή μετάλλαξη στο γενικό πληθυσμό και αφορά στην απουσία μίας φαινυλαλανίνης στη θέση 508, και συγκεκριμένα στην περιοχή σύνδεσης της CFTR με το ATP. Η μετάλλαξη ΔF508del προκαλεί ανώμαλη αναδίπλωση της CFTR και επακόλουθη αποδόμηση της παραγόμενης ελαττωματικής πρωτεΐνης.<sup>(21)</sup>

Οι ρυθμιστές των διαύλων ιόντων (ion channel modulators) είναι μικρές μοριακές ενώσεις που στοχεύουν στην αποκατάσταση της πρωταρχικής βλάβης της CFTR όσον αφορά την παραγωγή της πρωτεΐνης ή/και τη λειτουργία αυτής στη μετακίνηση ιόντων χλωρίου διαμέσου του διαύλου ιόντων. Η ετερογένεια των επιπτώσεων στη CFTR λόγω των διαφορετικών μεταλλάξεων εξηγεί γιατί οι ρυθμιστές των διαύλων ιόντων μπορούν να στοχεύσουν συγκεκριμένες μεταλλάξεις. Έχουν αναπτυχθεί τρεις κατηγορίες φαρμάκων, οι ενισχυτές (potentiators), οι οποίοι στοχεύουν στην ελαττωματική ρύθμιση και αγωγιμότητα, οι επιδιορθωτές (correctors), οι οποίοι στοχεύουν στην ελαττωματική επεξεργασία, και τα μόρια προσπέλασης του πρόωρου κωδικονίου λήξης που στοχεύουν στη διάσωση σύνθεσης (production correctors ή read-through agents).<sup>(4)</sup>

Ο όρος “CF theratype” χρησιμοποιείται για την κατηγοριοποίηση των μεταλλάξεων στο γονίδιο της CFTR ανάλογα με την επίδρασή τους στην πρωτεΐνη που κωδικοποιεί και την απόκρισή τους στη χρήση ρυθμιστών και ενισχυτών. Αυτή η θεωρία προβλέπει ότι ο γονότυπος της ΚΙ, σε συγκεκριμένο για κάθε ασθενή γενετικό υπόβαθρο, παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με διάφορους ρυθμιστές διαύλων ιόντων, ώστε να βελτιστοποιηθεί η εξατομίκευση της θεραπείας.<sup>(22)</sup> Οι μεταλλάξεις που δεν ανήκουν σε κάποια κατηγορία, αρχικά ταξινομούνται σε ομάδες ανάλογα με την επίδρασή τους στην ποσότητα και λειτουργία της CFTR. Ο όρος έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει τις μεταλλάξεις σύμφωνα με την απόκριση στη χρήση ρυθμιστών της CFTR σε διάφορα

μοντέλα, τα οποία μπορεί να περιλαμβάνουν λειτουργικούς και βιοχημικούς δείκτες. Μπορεί να επιτευχθεί παρόμοια λειτουργική απόκριση στη χρήση ενός ρυθμιστή διαύλων ιόντων σε διαφορετικές μεταλλάξεις, ωστόσο ο μοριακός μηχανισμός δράσης που ευθύνεται για την απόκριση αυτή μπορεί να διαφέρει. Το *theratyping* μπορεί να επιτευχθεί με την αξιολόγηση των ρυθμιστών διαύλων ιόντων σε ποικιλία κυττάρων ή κυττάρων που προέρχονται από ασθενείς που περιλαμβάνουν διάφορα συστημικά μοντέλα. Οι στόχοι του *theratyping* είναι: (1) να χαρακτηριστούν πλήρως οι CFTR μεταλλάξεις, (2) να αξιολογηθεί η απόκριση σε ρυθμιστές όσον αφορά σπάνιες μεταλλάξεις, (3) να συγκριθούν οι αποκρίσεις σε διάφορους ρυθμιστές σε περιπτώσεις διαφορετικών μεταλλάξεων, χρησιμοποιώντας ως αναφορά είτε μία γνωστή μετάλλαξη είτε τον ίδιο τον ασθενή. Αυτά τα δεδομένα θα μπορούσαν να παρουσιάσουν όφελος σε ασθενείς με ΚΙ που φέρουν σπάνιους πολυμορφισμούς και δεν ανήκουν σε κάποια θεραπευτική κατηγορία, ώστε να διευρυνθεί η πρόσβαση σε ρυθμιστές, ή σε ασθενείς για τους οποίους υπάρχουν πολλές θεραπευτικές επιλογές και ανάγκη διαλογής της βέλτιστης.<sup>(23)</sup>

Κυτταρικά μοντέλα ειδικά για κάθε ασθενή, τα οργανοειδή, μπορούν να εκφράζουν το πολυμορφικό cDNA του CFTR γονιδίου σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από το γαστρεντερικό σωλήνα, την αναπνευστική οδό και το αίμα ασθενών με ΚΙ. Αυτά τα μοντέλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της απόκρισης σε διαφορετικούς ρυθμιστές της CFTR *in vitro*, πριν την κλινική εφαρμογή της θεραπείας.<sup>(24)</sup> Επιπλέον, ρυθμιστές άλλων διαύλων ιόντων, οι οποίοι μπορεί να αντισταθμίσουν τη δυσλειτουργία της CFTR, μπορεί να βοηθήσουν τους ασθενείς με ΚΙ ανεξάρτητα από το γονότυπό τους.<sup>(22)</sup> Έτσι, η εφαρμογή του *theratyping* ξεπερνά τον περιορισμό του γονότυπου ως δείκτη απόκρισης στη θεραπεία και επιτρέπει την πρόσβαση όλων των ασθενών, ανεξάρτητα από τον τύπο μετάλλαξης, σε θεραπευτικές κατηγορίες.



**Εικόνα 4.** Ομάδες μεταλλάξεων της CFTR. Οι μεταλλάξεις της CFTR χωρίζονται σε 6 διακριτές κατηγορίες με βάση τις ανωμαλίες στη σύνθεση, τη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Επεξεργασμένο από Mogayzel & Paranjape, *Pediatrics in Review*, 2014. <sup>(16)</sup>

## 2.1 Μεταλλάξεις ομάδας I και θεραπεία

Οι μεταλλάξεις της ομάδας I ανευρίσκονται περίπου στο 10% των ασθενών με ΚΙ, είναι ανεμνηνεύσιμες, με αλλαγή πλαισίου ανάγνωσης και μεταλλάξεις ματίσματος, με αποτέλεσμα την απουσία ή τη μειωμένη έκφραση της CFTR πρωτεΐνης. Στις ανεμνηνεύσιμες μεταλλάξεις εισάγεται ένα πρόωρο κωδικόνιο λήξης, το οποίο ευθύνεται για τον πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης και την παραγωγή μικρότερης, ασταθούς και μη λειτουργικής CFTR πρωτεΐνης. Οι πιο κοινές μεταλλάξεις της ομάδας αυτής είναι η W1282X και η G542X. Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις που στοχεύουν στη συγκεκριμένη ομάδα μεταλλάξεων χρησιμοποιούν μόρια προσπέλασης του πρόωρου κωδικονίου λήξης και στοχεύουν στη διάσωση σύνθεσης (production correctors ή read-through agents). <sup>(25)</sup>

Αρχικά, σε αρκετές κλινικές δοκιμές χρησιμοποιήθηκε ως πιθανή θεραπευτική επιλογή η γενταμυκίνη, αντιβιοτικό της ομάδας των αμινογλυκοσίδων, η οποία παρουσίασε όφελος σε ασθενείς με ΚΙ, καθώς βελτίωσε τη μεταφορά ιόντων χλωρίου στο ρινικό επιθήλιο. Ωστόσο λόγω των ανεπιθύμητων ενεργειών από την παρατεταμένη χρήση της συγκεκριμένης κατηγορίας αντιβιοτικών (νεφροτοξικότητα, ωτοτοξικότητα), η θεραπευτική αυτή προσέγγιση εγκαταλείφθηκε. <sup>(26)</sup>

Το Ataluren (PTC124) σχεδιάστηκε ως θεραπεία της ΚΙ που οφείλεται σε μεταλλάξεις ενός νουκλεοτιδίου οι οποίες οδηγούν σε πρόωρο κωδικόνιο λήξης. Ως αποτέλεσμα παρατηρείται

η ταχεία αποδόμηση του ανερμηνεύσιμου mRNA ή/και η μετάφραση μικρότερης μη λειτουργικής CFTR πρωτεΐνης. Ο μηχανισμός δράσης αποσκοπεί στη μεταγραφή του πρόωρου κωδικονίου λήξης, με την εισαγωγή ενός όμοιου tRNA, ώστε να παραχθεί φυσιολογικού μήκους πρωτεΐνη. Ο μηχανισμός καταστολής του πρόωρου κωδικονίου λήξης και αυξημένης έκφρασης CFTR χρησιμοποιείται και στη θεραπευτική προσέγγιση των αμινογλυκοσίδων. Μία πολυκεντρική και τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή φάσης III με χρήση placebo, δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά στον FEV<sub>1</sub> και στους πνευμονικούς παροξυσμούς ανάμεσα στο Ataluren και στη θεραπεία με placebo, με αποτέλεσμα το Ataluren να μην προχωρήσει ως θεραπεία της ΚΙ. <sup>(27)</sup> Παρόλα αυτά, οι συγγραφείς αποφάνθηκαν ότι το Ataluren μπορεί να παρουσιάσει όφελος σε ασθενείς που δε λαμβάνουν θεραπεία με εισπνεόμενη τομπραμυκίνη, καθώς διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η τομπραμυκίνη εμπλέκεται στο μηχανισμό δράσης του Ataluren. Μία μελέτη φάσης III βρίσκεται σε εξέλιξη και διερευνά την αποτελεσματικότητα του Ataluren σε ασθενείς που δε λαμβάνουν θεραπεία με το αντιβιοτικό. <sup>(25)</sup>

Η W1282X είναι μία μετάλλαξη στο καρβοξυτελικό άκρο της CFTR, η οποία έχει ως αποτέλεσμα μερική δραστηριότητα της πρωτεΐνης, ακόμη και στη μεταλλαγμένη μορφή της. Λόγω της υπολειπόμενης λειτουργικότητας της CFTR όταν εκφράζεται στην πλασματική μεμβράνη σε ικανή ποσότητα, χρησιμοποιήθηκε ο ενισχυτής ivacaftor (VX-770) με την υπόθεση ότι θα ενισχύσει τη δραστηριότητα της CFTR. Επιθηλιακά κύτταρα από το ρινικό βλεννογόνο ασθενούς με ΚΙ, ομόζυγο για την ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη W1282X, έδειξαν βελτιωμένη λειτουργία της CFTR με τη χρήση του ivacaftor. Συμπληρωματικά ενισχύθηκε η δράση του με το μηχανισμό διάσωσης σύνθεσης και τη χρήση της αμινογλυκοσίδης G418. Με τη χορήγηση του ivacaftor στο συγκεκριμένο ασθενή παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση στη συχνότητα των πνευμονικών παροξύνσεων και στο δείκτη μάζας σώματος, ενώ ο FEV<sub>1</sub> παρέμεινε σταθερός σε διάστημα τριών ετών. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η χρήση του ivacaftor σε έναν ασθενή ομόζυγο για τη μετάλλαξη W1282X επέφερε μέτριο κλινικό όφελος και η θεραπεία με ενισχυτές της CFTR μπορεί να παρουσιάσει όφελος σε ασθενείς με μεταλλάξεις υπολειπόμενης λειτουργικότητας, με πρόωρο κωδικόνιο λήξης. <sup>(28)</sup>

## 2.2 Μεταλλάξεις ομάδας II και θεραπεία

Οι μεταλλάξεις της ομάδας II, περιλαμβανομένης της πιο κοινής μετάλλαξης Phe508del (ΔF508del), έχουν συσχετιστεί με διαταραχές στην ωρίμανση και μεταφορά της CFTR. Αν και η σύνθεση της CFTR είναι φυσιολογική, παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις και μεταλλάξεις ελλείμματος εντός πλαισίου ανάγνωσης εμποδίζουν τη φυσιολογική αναδίπλωση και μεταφορά της CFTR στην κυτταρική επιφάνεια. <sup>(25)</sup> Δεδομένου ότι οι μεταλλάξεις της

δεύτερης ομάδας επηρεάζουν την ικανότητα της CFTR να μεταφερθεί στην κυτταρική μεμβράνη και κατ' επέκταση οδηγούν σε απώλεια αυτής από τη μεμβράνη, έχουν συσχετιστεί με σοβαρές φαινοτυπικές διαταραχές.

Το 90% των ασθενών με ΚΙ φέρουν τη μετάλλαξη ΔF508del σε τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο, ενώ περίπου 50% των ασθενών είναι ομόζυγοι για τη μετάλλαξη αυτή. Η ΔF508del μετάλλαξη αφορά την απώλεια τριών νουκλεοτιδίων και εντοπίζεται στο εξόνιο 10 του γονιδίου της CFTR. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη εμποδίζει τη φυσιολογική αναδίπλωση της CFTR, οδηγώντας στην παραμονή της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο και την αποδόμησή της από το πρωτεάσωμα, ενώ μικρή μόνο ποσότητά της φτάνει στην κορυφαία κυτταρική μεμβράνη.<sup>(22)</sup>

Μόρια που μπορούν να αποτρέψουν την αποδόμηση της ελαττωματικής CFTR ονομάζονται επιδιορθωτές (correctors) και επιτρέπουν την επαρκή έκφραση της πρωτεΐνης στην κυτταρική επιφάνεια. Ένας πρώτης γενιάς επιδιορθωτής, το lumacaftor (VX-809), αποκατέστησε την αναδίπλωση της CFTR και αύξησε τη λειτουργία της σε ομόζυγα για τη ΔF508del βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα *in vitro* σε περίπου 14% της φυσιολογικής δραστηριότητας. Σε ομόζυγους ασθενείς για τη ΔF508del η μονοθεραπεία με lumacaftor οδήγησε σε δοσοεξαρτώμενη μείωση στις τιμές του χλωρίου στον ιδρώτα, αλλά δε βελτίωσε την πνευμονική λειτουργία σε μία κλινική δοκιμή φάσης II.<sup>(29)</sup>

Η λειτουργία του ενισχυτή ivacaftor (VX-770) απαιτεί την παρουσία της πρωτεΐνης στην πλασματική μεμβράνη, και το γεγονός αυτό εξηγεί τη μη στατιστικά σημαντική αύξηση του FEV<sub>1</sub> και την ελάχιστη μείωση των επιπέδων χλωρίου στον ιδρώτα που παρατηρήθηκε σε κλινική δοκιμή φάσης II ασθενών ηλικίας άνω των 12 ετών ομόζυγων για τη ΔF508del. Συνεπώς το ivacaftor ως μονοθεραπεία δεν αποτελεί αποτελεσματική θεραπευτική στρατηγική για ασθενείς ομόζυγους για τη ΔF508del.<sup>(27)</sup>

Η μετάλλαξη ΔF508del δεν οδηγεί μόνο σε ελαττωματική ωρίμανση της CFTR αλλά και σε μειωμένο χρόνο ανοίγματος του διαύλου, καθώς και σε μειωμένη σταθερότητα της κυτταρικής επιφάνειας, όταν η πρωτεΐνη φτάσει στην πλασματική μεμβράνη, οδηγώντας σε βλάβες των ομάδων I και II. Τα παραπάνω αποτελούν μία πιθανή εξήγηση όσον αφορά τα αποτελέσματα για τη μονοθεραπεία με lumacaftor. Γι' αυτό το λόγο προτάθηκε ο συνδυασμός του lumacaftor, το οποίο διορθώνει την ενδοκυττάρια ωρίμανση της CFTR, με το ivacaftor, το οποίο αποτελεί ενισχυτή και βελτιώνει τη λειτουργία της CFTR όταν αυτή φτάσει στην πλασματική μεμβράνη.<sup>(25)</sup> Σε προκλινικές δοκιμές *in vitro*, η προσθήκη του ivacaftor σχεδόν διπλασίασε το λειτουργικό όφελος που παρουσιάστηκε με τη χρήση μόνο του lumacaftor σε ασθενείς ομόζυγους για τη ΔF508del σε περίπου 25% της φυσιολογικής δραστηριότητας της CFTR σε βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα. Στις μελέτες TRAFFIC και

TRANSPORT, οι οποίες αποτελούν κλινικές δοκιμές φάσης III, ο συνδυασμός lumacaftor/ivacaftor οδήγησε σε σημαντική βελτίωση της πνευμονικής λειτουργίας με χρησιμοποιούμενο δείκτη τον FEV<sub>1</sub> και σε μείωση των αναπνευστικών παροξύνσεων σε ασθενείς ομόζυγους για τη ΔF508del.<sup>(30)</sup> Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στον FEV<sub>1</sub> σε ασθενείς ετερόζυγους για τη ΔF508del, αν και παρατηρήθηκαν αλλαγές στη συγκέντρωση ιόντων χλωρίου στον ιδρώτα.<sup>(31)</sup> Μία μελέτη παρατήρησης έδειξε ότι η παρατεταμένη θεραπεία με το συνδυασμό lumacaftor/ivacaftor για τρία χρόνια μειώνει το ρυθμό επιδείνωσης της πνευμονικής λειτουργίας και τον κίνδυνο πνευμονικών παροξύνσεων σε ασθενείς ηλικίας άνω των 12 ετών που είναι ομόζυγοι για τη μετάλλαξη ΔF508del.<sup>(27)</sup>

Επίσης, η χρόνια χορήγηση του ivacaftor φάνηκε ότι προκαλεί δοσοεξαρτώμενη αναστροφή της διορθωμένης από το lumacaftor CFTR πρωτεΐνης σε καλλιέργειες κυττάρων ομόζυγων για τη ΔF508del. Αυτό το αποτέλεσμα υποδεικνύει την αποσταθεροποίηση της διορθωμένης CFTR εξαιτίας του ivacaftor, μειώνοντας τα επίπεδά της στην πλασματική μεμβράνη, και παρουσιάζει μια αρνητική αλληλεπίδραση του ivacaftor με το lumacaftor σε χρόνια χρήση. Χρόνια αγωγή με ivacaftor μείωσε ακόμη τα επίπεδα και τη λειτουργία της ώριμης wild-type CFTR. Έτσι, ο συνδυασμός αυτών των μορίων για τη μεγιστοποίηση της διάσωσης της CFTR μπορεί να απαιτεί αλλαγές στη δοσολογία ή/και ανάπτυξη νέων μορίων ενισχυτών, οι οποίοι δε θα εμπλέκονται στη σταθερότητα της πρωτεΐνης.<sup>(32)</sup> Ο συνδυασμός lumacaftor/ivacaftor έχει λάβει έγκριση από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (U.S. Food and Drug Administration, FDA) ως θεραπεία της ΚΙ σε ασθενείς ομόζυγους για τη ΔF508del, ηλικίας 6 ετών και άνω.<sup>(22)</sup> Εκτός από τις ΗΠΑ, ο συνδυασμός ivacaftor/lumacaftor έχει λάβει έγκριση και στον Καναδά, την Ευρωπαϊκή Ένωση και την Ελβετία για ασθενείς με ΚΙ ομόζυγους για τη ΔF508del ηλικίας 6 ετών και άνω, ενώ στην Αυστραλία και το Ισραήλ έχει εγκριθεί για την ίδια κατηγορία ασθενών ηλικίας 12 ετών και άνω.<sup>(9)</sup>

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες και αλληλεπιδράσεις φαρμάκων που εμφάνισε το lumacaftor, όπως στένωση των βρόγχων με συμπτώματα δύσπνοιας και επαγωγή του κυτοχρώματος P4503A, έδωσαν το έναυσμα για την ανάπτυξη ενός νέου επιδιορθωτή, του tezacaftor (VX-661). Το tezacaftor είναι ένας επιδιορθωτής της CFTR με βελτιωμένες φαρμακοκινητικές ιδιότητες και λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες. Σε κλινική δοκιμή, ο συνδυασμός tezacaftor/ivacaftor σε ασθενείς ηλικίας 12 ετών και άνω οι οποίοι ήταν ομόζυγοι για τη μετάλλαξη ΔF508del, έδειξε κλινική αποτελεσματικότητα συγκρίσιμη με το συνδυασμό lumacaftor/ivacaftor, αλλά λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες.<sup>(33)</sup> Επιπλέον ο συνδυασμός tezacaftor/ivacaftor σε ασθενείς ετερόζυγους για τη μετάλλαξη ΔF508del και φορείς μιας μετάλλαξης υπολειπόμενης λειτουργικότητας της CFTR στο δεύτερο αλληλόμορφο φάνηκε



αποτελεσματικός και ασφαλής.<sup>(34)</sup> Έτσι, ο συνδυασμός tezacaftor/ivacaftor έχει λάβει έγκριση από τον FDA ως θεραπεία σε ασθενείς ηλικίας 12 ετών και άνω, ομόζυγους για τη μετάλλαξη ΔF508del ή ετερόζυγους για τη ΔF508del μαζί με μια μετάλλαξη που οδηγεί σε υπολειπόμενη λειτουργία της CFTR.<sup>(22)</sup>

Παρά την ανάπτυξη αποτελεσματικών ρυθμιστών διαύλων ιόντων, σημαντικό ποσοστό των ασθενών με ΚΙ στερείται θεραπευτικών επιλογών που στοχεύουν την υποκείμενη αιτία της νόσου. Μέσα από φαινοτυπικό screening υψηλής απόδοσης, έχει προσδιοριστεί μία νέα κατηγορία ρυθμιστών της CFTR που ονομάζονται amplifiers. Το μόριο PTI-CH, που ανήκει σε αυτήν την κατηγορία, εμφανίζει διαφορετικά χαρακτηριστικά από αυτά των ήδη χρησιμοποιούμενων ρυθμιστών και διαχωρίζεται σαφώς από αυτούς. Το μόριο αυτό αντιστρέφει την ανεπάρκεια της βιοσύνθεσης της CFTR, αυξάνοντας την έκφραση της πρώιμης CFTR πρωτεΐνης σε διαφορετικούς τύπους μεταλλάξεων της CFTR, συμπεριλαμβανομένης της ΔF508del. Επιπλέον, μελέτες αναφέρουν ότι αυξάνει τη λειτουργία της CFTR σε ανθρώπινα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα και ενισχύει τη δράση των άλλων ρυθμιστικών μορίων, δρώντας συνεργικά. Αυτό επιτυγχάνεται λόγω της αύξησης της ποσότητας της CFTR πρωτεΐνης, η οποία υπόκειται στη δράση των υπόλοιπων ρυθμιστικών μορίων. Τέλος, ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η αύξηση της πρώιμης μορφής της CFTR μέσω του PTI-CH δεν επάγει απόκριση κυτταρικού stress.<sup>(35)</sup>

Η χρήση ενός amplifier σε συνδυασμό με την αγωγή lumacaftor/ivacaftor σε μία σπάνια μετάλλαξη της CFTR, την c.3700 A>G, που προκαλεί διαταραχές της επεξεργασίας και μειωμένη λειτουργικότητα του διαύλου, έδειξε βελτίωση της λειτουργίας της CFTR. Γενετικά τροποποιημένα με CRISPR/Cas9 βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα που έφεραν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη, στα οποία χρησιμοποιήθηκε ο παραπάνω συνδυασμός, εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα πρώιμης CFTR πρωτεΐνης και ενισχυμένη απόκριση στη θεραπεία με lumacaftor/ivacaftor. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα από πειράματα που διεξήχθησαν σε καλλιέργειες ρινικών επιθηλιακών κυττάρων με τη μετάλλαξη αυτή.<sup>(36)</sup>

Η μετάλλαξη ΔF508del οδηγεί σε παραγωγή CFTR πρωτεΐνης που είναι κινητικά και θερμοδυναμικά ασταθής στους 37 °C. Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι η σταθεροποίηση της πρώτης περιοχής πρόσδεσης νουκλεοτιδίου (NBD1), όπου βρίσκεται η μετάλλαξη ΔF508del, μειώνει τη λανθασμένη αναδίπλωση της CFTR, αν και η διόρθωση είναι περισσότερο εμφανής όταν συνυπάρχουν μεταλλάξεις που σταθεροποιούν τη διεπαφή μεταξύ της NBD1 και της δεύτερης υδρόφοβης διαμεμβρανικής περιοχής (MSD2). Οι αλλαγές αυτές, οι οποίες είναι αποτέλεσμα πολλαπλών μεταλλάξεων, υποδεικνύουν ότι μπορεί να είναι απαραίτητη η αλληλεπίδραση μικρών μορίων-επιδιορθωτών με τουλάχιστον δύο διακριτές θέσεις, ώστε να επιτευχθεί η διόρθωση της CFTR. Σε μία μελέτη φάνηκε ότι τρεις πιθανοί φαρμακολογικοί



μοριακοί συνοδοί (chaperones) σε συνδυασμό με έναν ενισχυτή παρέχουν αθροιστική και συνεργική βελτίωση της λειτουργικής έκφρασης της CFTR που φέρει τη μετάλλαξη ΔF508del. Η NBD1 φαίνεται να κατέχει τρεις λειτουργικά διακριτές περιοχές, καθώς και οι τρεις αυτοί επιδιορθωτές αλληλεπιδρούν με την NBD1. Έτσι, ο τριπλός συνδυασμός των μορίων VX-809, RDR1 και MCG1516A σε ανθρώπινα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα οδήγησε σε λειτουργική απόκριση που ήταν 196% αυτής που επετεύχθη με τη χρήση μόνο του VX-809. Τα δεδομένα αυτά ενθαρρύνουν την ανάπτυξη τριπλού συνδυασμού επιδιορθωτών.<sup>(37)</sup>

### 2.3 Μεταλλάξεις ομάδας III και θεραπεία

Οι μεταλλάξεις της ομάδας III οδηγούν σε μειωμένη πιθανότητα ανοίγματος του διαύλου χλωρίου (defective channel gating), παρόλο που η CFTR εκφράζεται σε φυσιολογικά επίπεδα στην πλασματική μεμβράνη. Ο δίαυλος δεν ανταποκρίνεται στη σύνδεση του ATP με αποτέλεσμα τη μειωμένη μεταφορά ιόντων χλωρίου. Η πιο κοινή μετάλλαξη της ομάδας III είναι η παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη Gly551Asp, την οποία φέρει περίπου το 5% των ασθενών με ΚΙ.<sup>(27)</sup>

Το ivacaftor (VX-770) ανήκει στην κατηγορία των ενισχυτών και βρέθηκε ότι ενισχύει τη διαπερατότητα του διαύλου αυξάνοντας το χρόνο που ο δίαυλος παραμένει στην ανοιχτή του κατάσταση και αποκαθιστά τη λειτουργία της CFTR σε κύτταρα που φέρουν τη μετάλλαξη Gly551Asp. Στη μελέτη STRIVE (κλινική δοκιμή φάσης III) που πραγματοποιήθηκε το 2011 και περιελάμβανε ασθενείς άνω των 12 ετών, το ivacaftor εμφάνισε σημαντικά θεραπευτικά οφέλη σε ασθενείς που έφεραν τη μετάλλαξη Gly551Asp σε σχέση με το placebo. Συγκεκριμένα η χορήγηση του ivacaftor είχε ως αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα χλωρίου στον ιδρώτα, αύξηση του FEV<sub>1</sub>, μείωση των πνευμονικών παροξύνσεων και αύξηση του βάρους.<sup>(38)</sup> Ανάλογα ήταν τα αποτελέσματα της μελέτης ENVISION (κλινική δοκιμή φάσης III) που διεξήχθη σε παιδιά ηλικίας 6-11 ετών.<sup>(39)</sup> Τα παραπάνω αποτελέσματα οδήγησαν στην έγκριση του ivacaftor το 2012 από τον FDA ως θεραπεία σε ασθενείς ηλικίας 6 ετών και άνω που φέρουν τουλάχιστον μία μετάλλαξη Gly551Asp.<sup>(22)</sup>

Τα δεδομένα των κλινικών δοκιμών με χρήση placebo σε συνδυασμό με δεδομένα από *in vitro* μελέτες συνέστησαν τη χρήση του ivacaftor ως μονοθεραπεία και σε ασθενείς με σπάνιες μεταλλάξεις της ομάδας III (G178R, S549N, S549R, G551S, G1244E, S1251N, S1255P, και G1349D), καθώς και στη μετάλλαξη R117H, που παρουσιάζει χαρακτηριστικά ελλείμματος τόσο στη διαπερατότητα του διαύλου όσο και στην αγωγιμότητα. Η χρήση του ivacaftor ως θεραπεία για την ΚΙ ενισχύεται από δεδομένα που αναφέρουν ότι η παρατεταμένη χρήση του για τρία χρόνια μειώνει το ρυθμό επιδείνωσης της πνευμονικής

λειτουργίας και τον κίνδυνο πνευμονικών παροξύνσεων. Τα παραπάνω οδήγησαν στην έγκριση του ivacaftor το 2017 από τον FDA για χρήση σε ασθενείς ηλικίας άνω των δύο ετών που φέρουν τουλάχιστον μία από επιπλέον 23 μεταλλάξεις υπολειπόμενης λειτουργικότητας της CFTR, ώστε συνολικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε 38 διαφορετικές μεταλλάξεις (Πίνακας 2). Στη μελέτη ARRIVAL (κλινική δοκιμή φάσης III) αξιολογήθηκε η χρήση του ivacaftor σε προνήπια ηλικίας 12 έως 24 μηνών με επιβεβαιωμένη διάγνωση ΚΙ και τουλάχιστον μία μετάλλαξη της CFTR που αφορά το άνοιγμα του διαύλου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ivacaftor ήταν γενικά ασφαλές και καλά ανεκτό στη συγκεκριμένη κατηγορία ασθενών και σχετίστηκε με μείωση της συγκέντρωσης χλωρίου στον ιδρώτα. Η βελτίωση των δεικτών της παγκρεατικής λειτουργίας που παρατηρήθηκε υποδηλώνει τη σημασία της πρώιμης έναρξης της αγωγής με ivacaftor για τη διατήρηση της παγκρεατικής λειτουργίας. Η μελέτη αυτή συνεχίζεται σε βρέφη ηλικίας κάτω των 12 μηνών.<sup>(40)</sup>

**Πίνακας 2.** Μεταλλάξεις του γονιδίου της CFTR που ανταποκρίνονται στη θεραπεία με ivacaftor. Πορτοκαλί: εγκρίθηκαν μετά από δοκιμές *in vivo*, Γκρι: εγκρίθηκαν μετά από δοκιμές *in vitro*. Επεξεργασμένο από McElvaney et al., *Expert Review of Respiratory Medicine*, 2018.<sup>(9)</sup>

E56K	G178R	S549R	S977F	F1074L	2789+5G→A
P67L	E193K	G551D	F1052V	D1152H	3272-26A→G
R74W	L206W	G551S	K1060T	G1244E	3849+10kbC→T
D110E	R347H	D579G	A1067T	S1251N	
D110H	R352Q	711+3A→G	G1069R	S1255P	
R117C	A455E	E831X	R1070Q	D1270N	
R117H	S549N	S945L	R1070W	G1349D	

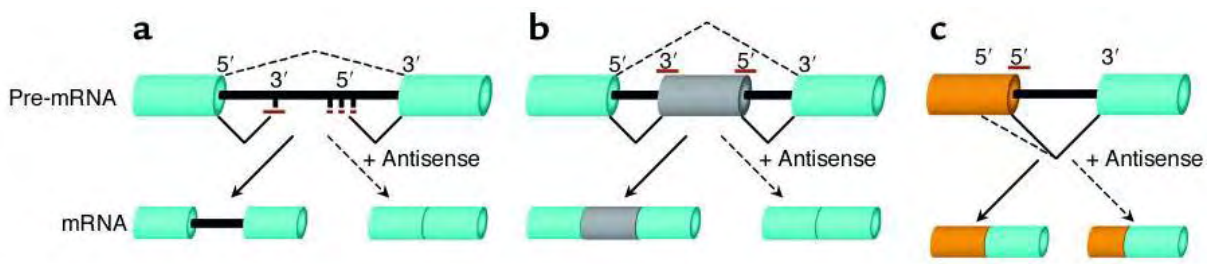
## 2.4 Μεταλλάξεις ομάδας IV και θεραπεία

Οι μεταλλάξεις της ομάδας IV οδηγούν σε μειωμένη αγωγιμότητα του διαύλου λόγω ανωμαλιών στη δομή του πόρου του διαύλου, παρόλο που τα επίπεδα έκφρασης της CFTR στην πλασματική μεμβράνη είναι φυσιολογικά. Οι μεταλλάξεις της ομάδας IV, όπως η παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη Arg117His, οδηγούν συνήθως σε ηπιότερο φαινότυπο λόγω της μερικής λειτουργίας της CFTR. Η Arg117His ευθύνεται για το 2% των μεταλλάξεων της CFTR στη Βόρεια Ευρώπη και ευθύνεται για ανωμαλίες στο άνοιγμα (ομάδα III) και την αγωγιμότητα (ομάδα IV) του διαύλου. Σύμφωνα με τη μελέτη KONDUCT (κλινική δοκιμή φάσης III) που διεξήχθη σε παιδιά άνω των 6 ετών με ΚΙ τα οποία ήταν φορείς της μετάλλαξης Arg117His, η χορήγηση του ivacaftor είχε θετική επίδραση στην εξέλιξη της σχετιζόμενης με ΚΙ πνευμονικής νόσου.<sup>(25)</sup> Το ivacaftor έχει λάβει έγκριση από τον FDA ως μονοθεραπεία σε ασθενείς άνω των δύο ετών που φέρουν τουλάχιστον μία μετάλλαξη υπολειπόμενης λειτουργικότητας της CFTR, παρέχοντας τη δυνατότητα χρήσης του φαρμάκου σε ασθενείς με σπάνιες μεταλλάξεις.<sup>(27)</sup>

## 2.5 Μεταλλάξεις ομάδας V και θεραπεία

Οι μεταλλάξεις της ομάδας V αντιπροσωπεύουν περίπου το 13% των μεταλλάξεων που προκαλούν ΚΙ και χαρακτηρίζονται από ελαττωματική επεξεργασία του mRNA λόγω εναλλακτικού ματίσματος ή μεταλλάξεων στον υποκινητή με αποτέλεσμα μειωμένη συγκέντρωση λειτουργικής CFTR πρωτεΐνης στην κορυφαία κυτταρική μεμβράνη.<sup>(25)</sup> Οι πιο χαρακτηριστικές μεταλλάξεις της ομάδας αυτής είναι η 3849+10Kb C>T και η 3272-26A>G, οι οποίες οδηγούν σε ηπιότερο κλινικό φαινότυπο και συνήθως χαρακτηρίζονται από φυσιολογικές τιμές ηλεκτρολυτών στο τεστ ιδρώτα. Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων εναλλακτικού ματίσματος επηρεάζει τα 5' και 3' άκρα των εξωνίων και οδηγεί σε αποκοπή του εξωνίου από το ώριμο μετάγραφο. Μεταλλάξεις εντός των ιντρονίων μπορεί να δημιουργήσουν νέες θέσεις ματίσματος επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο τη διαδικασία του εναλλακτικού ματίσματος (Εικόνα 5). Συγκεκριμένα, η μετάλλαξη 3849+10Kb C>T δημιουργεί μία έκτοπη θέση ματίσματος στο 5' άκρο του ιντρονίου 19 του πρώιμου CFTR mRNA και ενεργοποιεί μία νέα θέση ματίσματος στο 3' άκρο, αφήνοντας ακέραιες τις φυσιολογικές (wild-type) θέσεις ματίσματος. Με αυτόν τον τρόπο, το παραγόμενο mRNA θα μπορούσε να διατηρήσει τη φυσιολογική ώριμη μορφή του, αν αναστέλλονταν οι έκτοπες θέσεις ματίσματος. Αυτή η μετάλλαξη αντιπροσωπεύει σχεδόν το 2% των περιπτώσεων ΚΙ με μεγαλύτερη επίπτωση στον πληθυσμό των Εβραίων Ασκενάζι. Η χρήση αντινοσηματικών 2'-Ο-μεθυλ-ολιγονουκλεοτιδίων που στοχεύουν τις 5' ή 3' έκτοπες θέσεις ματίσματος σε κυτταρικές σειρές οδήγησε σε φυσιολογική επεξεργασία του πρόδρομου mRNA του CFTR γονιδίου και δόσοεξαρτώμενη αύξηση της CFTR πρωτεΐνης στη γλυκοζυλιωμένη της μορφή. Η χορήγηση και των δύο ολιγονουκλεοτιδίων ταυτόχρονα παρουσίασε αθροιστικό όφελος.<sup>(41)(42)</sup>

Η μετάλλαξη ματίσματος c.2657+5G>A εντοπίζεται στο ιντρόνιο 16 (περιοχή IVS16) και έχει βρεθεί ότι ευθύνεται για τη δημιουργία μεταγράφων με έλλειψη του εξωνίου 16 καθώς και wild-type μεταγράφων. Δύο αντικωδικά ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά για το πρώιμο mRNA της περιοχής IVS16 χρησιμοποιήθηκαν ώστε να επιδιορθωθεί το εναλλακτικό μάτισμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εξώνιο 16 αποκαταστάθηκε σχεδόν πλήρως και οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα της CFTR στην πλασματική μεμβράνη, καθώς και σε αυξημένη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης.<sup>(43)</sup>



**Εικόνα 5.** Τροποποίηση ματίσματος από αντικωδικά ολιγονουκλεοτίδια. Το εναλλακτικό μάτισμα αποφεύγεται και αποκαθίσταται στο φυσιολογικό από ολιγονουκλεοτίδια που εμποδίζουν τις 5' και 3' νέες έκτοπες θέσεις ματίσματος (a), παρακάμπτουν ένα φυσιολογικό εξώνιο (b) ή οδηγούν στην επιλογή εναλλακτικής 5' θέσης ματίσματος (c). Επεξεργασμένο από Kole & Sazani, *The Journal of Clinical Investigation*, 2003.<sup>(41)</sup>

## 2.6 Μεταλλάξεις ομάδας VI και θεραπεία

Οι μεταλλάξεις της ομάδας VI χαρακτηρίζονται από λειτουργική αλλά ασταθή CFTR, που έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη σταθερότητα της πρωτεΐνης στην πλασματική μεμβράνη και τη μείωση του χρόνου ημίσειας ζωής της ώριμης γλυκοζυλιωμένης μορφής της.<sup>(25)</sup> Σε αυτήν την ομάδα μεταλλάξεων έχουν προταθεί μόρια-σταθεροποιητές (stabilizers) ως θεραπευτικοί στόχοι. Το μόριο cavosonstat (N91115) αποτελεί ρυθμιστή της CFTR, ο οποίος φαίνεται ότι αυξάνει τη σταθερότητα της CFTR, μειώνοντας την αποσύνθεσή της από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) και παρατείνοντας το χρόνο παραμονής της πρωτεΐνης στην πλασματική μεμβράνη. Το μόριο αυτό αναστέλλει τη ρεδουκτάση της S-νιτρογλουταθειόνης (S-nitrosoglutathione reductase, GSNOR) και κατ' επέκταση διατηρεί τα επίπεδα της S-νιτρογλουταθειόνης (S-nitrosoglutathione, GSNO). Η GSNOR, ως κύριο καταβολικό ένζυμο, μειώνει τα επίπεδα της GSNO και μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη σταθερότητα της CFTR. Επιπλέον φαίνεται ότι η έκφραση και η λειτουργία της GSNOR αυξάνονται σε κύτταρα που φέρουν τη μετάλλαξη ΔF508del. Η χρήση του cavosonstat σε συνδυασμό με επιδιορθωτές ή επιδιορθωτές/ενισχυτές *in vitro* οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκφρασης και λειτουργίας της CFTR στην πλασματική μεμβράνη κυττάρων που έφεραν την ΔF508del, ενώ η μονοθεραπεία με cavosonstat αποκαθιστά μερικώς τη λειτουργία της CFTR σε ποντίκια που φέρουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Έτσι, η αναστολή της GSNOR και η αύξηση της συγκέντρωσης της GSNO φαίνεται ότι επηρεάζουν τη σταθερότητα της CFTR μέσω τροποποίησης πρωτεϊνών που ενέχονται στη διαδικασία αποδόμησης της πρωτεΐνης. Ο παραπάνω μηχανισμός προτάθηκε ως συμπληρωματικός στη χρήση των ρυθμιστών διαύλων ιόντων.<sup>(44)</sup> Η χρήση του cavosonstat ως θεραπεία για την ΚΙ βρίσκεται υπό διερεύνηση σε δύο κλινικές δοκιμές φάσης II που διεξάγονται αφενός σε ασθενείς ομόζυγους για την ΔF508del (NCT02589236) και αφετέρου σε ασθενείς ετερόζυγους για την ΔF508del και φορείς μίας μετάλλαξης ανοίγματος του διαύλου (NCT02724527).

Παρά την πρόοδο στη θεραπεία της ΚΙ, που επιτεύχθηκε με τη χρήση των νέων ρυθμιστών διαύλων ιόντων, παραμένει επιτακτική η ανάγκη αναζήτησης νέων μορίων με στόχο τη βελτιστοποίηση των θεραπευτικών προσεγγίσεων της νόσου (Πίνακας 3).

**Πίνακας 3.** Θεραπευτικές προσεγγίσεις της ΚΙ υπό ανάπτυξη για τις διάφορες ομάδες μεταλλάξεων. Επεξεργασμένο από McElvaney et al., *Expert Review of Respiratory Medicine*, 2018.<sup>(9)</sup>

Name	Company	Category	Target CFTR mutation class	Phase of development
VX-561	Vertex	Potentiator	III	II
GLPG1837	Galapagos	Potentiator	III	II
GLPG2451	Galapagos	Potentiator	III	I
GLPG2222	Galapagos	Corrector	II	II
QBW251	Novartis	Corrector	II, III, VI	II
VX-445	Vertex	Corrector	II, II/I-II	III (with tezacaftor/ivacaftor)
VX-659	Vertex	Corrector	II, II/I-II	III (with tezacaftor/ivacaftor)



### 3. ΔΙΑΥΛΟΙ ΙΟΝΤΩΝ ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Οι διάλυλοι ιόντων εκτός του CFTR αποτελούν υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση, καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε όλους τους ασθενείς με ΚΙ ανεξάρτητα από το γονότυπό τους. Η φαρμακολογική ρύθμιση των εναλλακτικών διαύλων ιόντων θα μπορούσε επίσης να αυξήσει τα οφέλη της θεραπείας με ρυθμιστές της CFTR σε ασθενείς με ΚΙ που φέρουν μεταλλάξεις που ανταποκρίνονται στη θεραπεία με ρυθμιστές. Οι διάλυλοι που έχουν προταθεί ως εναλλακτικοί θεραπευτικοί στόχοι είναι ο διάλυλος ιόντων νατρίου και διάλυλοι ιόντων χλωρίου, όπως ο διάλυλος χλωρίου που ενεργοποιείται από το ασβέστιο με διαμεμβρανική πρωτεΐνη 16A (TMEM16A) και ο SLC26A9, μέλος της οικογένειας των διαλυτών μεταφορέων 26 (SLCA). Οι παραπάνω διάλυλοι βοηθούν στη διατήρηση της έκκρισης ιόντων χλωρίου στο αναπνευστικό επιθήλιο μετά από ενεργοποίηση (Πίνακας 4).<sup>(22)</sup>

**Πίνακας 4.** Γνωστοί ενεργοί φαρμακολογικοί παράγοντες που στοχεύουν εναλλακτικούς διαύλους ιόντων εκτός της CFTR και υπάρχουσες δοκιμές σε ασθενείς με ΚΙ. Επεξεργασμένο από Strug et al., *Human molecular genetics*, 2018.<sup>(45)</sup>

Agent	Class	Company	Status
QUB-TL1	Inhibition of ENaC-activating proteases	-	Pre-clinical
NAP858	Inhibition of ENaC-activating proteases	-	Pre-clinical
SPX-101	SPLUNC-1 peptide mimetic (stimulates ENaC)	Spyryx Biosciences	Phase II
GSK2225745	ENaC <sub>x</sub> siRNA	GlaxoSmithKline Plc	Pre-clinical
IONIS-ENAC-2.5 <sub>Rx</sub>	Antisense oligonucleotides (ASOs) against ENaC <sub>x</sub>	Ionis Pharmaceuticals	Pre-clinical
NVP-QBE170	ENaC inhibitor	Novartis	Pre-clinical
AZD5634	ENaC inhibitor	AstraZeneca	Phase Ib
ETD-001	Long-acting ENaC inhibitor	Enterprise Therapeutics	Pre-clinical
QBW276	ENaC inhibitor	Novartis	Phase II
ET000516-A-2	THEM16A activator	Enterprise Therapeutics	Pre-clinical

### 3.1 Ρυθμιστές του επιθηλιακού διαύλου νατρίου

Στους ασθενείς με ΚΙ, η μειωμένη έκκριση χλωρίου λόγω της βλάβης στη CFTR πρωτεΐνη συνοδεύεται από αυξημένη δραστηριότητα του επιθηλιακού διαύλου νατρίου, που έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη απορρόφηση νατρίου και υγρών και κατά συνέπεια συμβάλλει στην αφυδάτωση της επιφάνειας των αεραγωγών και στη δυσλειτουργική βλεννοκροσσωτή κάθαρση. Συνεπώς, αναστολείς του επιθηλιακού διαύλου νατρίου (epithelial sodium channel, ENaC) έχουν προταθεί ως θεραπευτικά μόρια, ώστε να βελτιωθεί η ενυδάτωση της επιφάνειας των αεραγωγών.<sup>(22)</sup>

Ο ENaC αποτελείται από τρεις ομόλογες υπομονάδες (α, β και γ) οι οποίες έχουν μεγάλες εξωκυττάριας θηλιές που παίζουν σημαντικό ρόλο στη δραστηριότητα του διαύλου. Πρωτεόλυση των εξωκυττάριας θηλιών στις α και γ υπομονάδες από μια οικογένεια πρωτεασών που ενεργοποιούν διαύλους (channel activating proteases, CAPs) αυξάνει την πιθανότητα ανοίγματος του διαύλου και τη δραστηριότητά του. Κατά συνέπεια, η αυξημένη δραστηριότητα του ENaC που παρατηρείται σε επιθήλια με δυσλειτουργία της CFTR πιστεύεται ότι οφείλεται σε αυξημένη πρωτεολυτική ενεργοποίηση του διαύλου.<sup>(45)</sup> Πρόσφατα βρέθηκε επίσης ότι η ελαστάση των ουδετεροφίλων καθώς και πρωτεάσες που απελευθερώνονται από φλεγμονώδη κύτταρα και βακτήρια σε αεραγωγούς με ΚΙ, μπορούν να ενεργοποιήσουν τον ENaC απευθείας με πρωτεολυτική διάσπαση, ανεξάρτητα από τη μετάλλαξη της CFTR.<sup>(47)</sup>

Ένα πεπτίδιο που προέρχεται από τον επιθηλιακό κλώνο 1 της υπερώας, των πνευμόνων και της ρινός (shortpalate, lung, and nasal epithelial clone 1, SPLUNC1), το SPX-101, προσδένεται ειδικά σε ώριμες υπομονάδες του ENaC και φαίνεται ότι προάγει την εσωτερίκευση του διαύλου. Η αλληλεπίδραση του ENaC με το SPLUNC1 εξαρτάται από το pH με αποτέλεσμα το SPLUNC1 να μην μπορεί να αναστείλει την απορρόφηση νατρίου στο όξινο περιβάλλον του αεραγωγού με ΚΙ. Ωστόσο, έχει βρεθεί μία περιοχή κοντά στο αμινοτελικό άκρο του SPLUNC1 η οποία μπορεί να αναστείλει τον ENaC χωρίς να εξαρτάται από το pH. Διαμόλυνση κυτταροκαλλιιεργειών των επιθηλιακών κυττάρων της κορυφαίας μεμβράνης του αναπνευστικού επιθηλίου με το πεπτίδιο S18 (18 αμινοξέα), είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηριότητας του ENaC σε τέτοιο βαθμό ώστε να φτάσει τη δράση του SPLUNC1 σε φυσιολογικό αναπνευστικό επιθήλιο, ενώ επίσης αποκατέστησε το υγρό της αναπνευστικής επιφάνειας. Σημαντικό πλεονέκτημα του SPX-101 είναι η παρατεταμένη διάρκεια δράσης του, η οποία μπορεί να απλοποιήσει το δοσολογικό σχήμα βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής των ασθενών, καθώς και η απουσία υπερκαλιαιμίας ή μείωσης όγκου, που παρατηρείται σε αναστολή του ENaC σε προκλινικά μοντέλα ζώων.<sup>(46)</sup>

Δεδομένου ότι ο ENaC ενεργοποιείται από πρωτεολυτική διάσπαση από διάφορες πρωτεάσες που ενεργοποιούν διαύλους, οι οποίες αυξάνονται στην ΚΙ, αναπτύχθηκε ένας νέος αναστολέας εξωκυττάρων πρωτεασών, ο QUB-TL1. Το μόριο αυτό βρέθηκε να βελτιώνει την ενυδάτωση της επιφάνειας του αεραγωγού και τη βλεννοκροσσωτή κάθαρση *in vitro*.<sup>(48)</sup>

Αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (antisense oligonucleotides, ASOs) έναντι του Scnn1a mRNA, που κωδικοποιεί την υπομονάδα α του ENaC, σχεδιάστηκαν ώστε να μειώσουν τη δραστηριότητα του ENaC στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού, οδηγώντας σε σημαντική μείωση των επιπέδων Scnn1a και βελτίωση των δεικτών της ΚΙ σε μοντέλα ποντικών. Δεν παρατηρήθηκε μείωση του Scnn1a στα νεφρά, γεγονός που επιβεβαιώθηκε από τις τιμές των ηλεκτρολυτών στα ούρα και στον ορό, λόγω του τρόπου χορήγησης με εισπνοή και όχι με συστηματική χορήγηση. Η στόχευση συγκεκριμένων αλληλουχιών RNA επιτρέπει υψηλή εκλεκτικότητα και ικανότητα αναστολής διαφορετικών υπομονάδων του ENaC. Τέλος, τα αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια μπορούν να χορηγηθούν σε χαμηλές δόσεις και χαμηλούς όγκους σε απλά διαλύματα με βάση το νερό, λόγω του αυξημένου χρόνου ημίσειας ζωής στους ιστούς και της διάρκειας της δράσης τους, με αποτέλεσμα οι δόσεις να μπορούν να χορηγούνται ακόμα και μηνιαία.<sup>(49)</sup>

Σε μία μελέτη, μετρήθηκε το πάχος του υγρού της επιφάνειας των αεραγωγών σε καλλιέργειες βρογχικών κυττάρων με ΚΙ και χωρίς ΚΙ, αφού αποσιωπήθηκε ο ENaC με την τεχνολογία των μικρών παρεμβατικών μορίων RNA (small interfering RNAs, siRNAs) και μετά από φαρμακολογική διέγερση της CFTR. Μεμονωμένα siRNAs συμπληρωματικά σε υπομονάδες του ENaC επαρκούν για να μειώσουν τα μετάγραφα του ENaC, τη δραστηριότητα του διαύλου νατρίου και τη διακίνηση υγρού. Ωστόσο, μόνο όταν αποσιωπούνται ταυτόχρονα και οι δύο υπομονάδες του ENaC- α και β- αυξάνεται το πάχος του υγρού της επιφάνειας των αεραγωγών. Ο συνδυασμός siRNAs για τις α και β υπομονάδες σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί να μειώσει σημαντικά τη δραστηριότητα του ENaC και να αυξήσει την ενυδάτωση των αεραγωγών σε βαθμό όμοιο με αυτόν μετά από χρήση συνδυασμού επιδιορθωτή και ενισχυτή σε κύτταρα με ΚΙ, και περίπου στο μισό σε σχέση με κύτταρα χωρίς ΚΙ στα οποία η CFTR είναι ενεργοποιημένη στο μέγιστο βαθμό. Αυτά τα δεδομένα έχουν ιδιαίτερη σημασία για τύπους μεταλλάξεων οι οποίοι δεν απαντούν σε θεραπεία με ρυθμιστικά μόρια και χρήζουν εναλλακτικής προσέγγισης. Η ανάπτυξη κατάλληλων φορέων για τη μεταφορά των siRNAs στους πνεύμονες αποτελεί μελλοντικό στόχο για τη χρήση τους ως θεραπευτικά μέσα στην ΚΙ.<sup>(50)</sup>

Η σημασία του ENaC στην *in vivo* παθογένεια της ΚΙ αναδείχθηκε περαιτέρω από μελέτες σε ποντίκια τα οποία υπερεκφράζουν την υπομονάδα β του ENaC (βENaC-Tg) στους αεραγωγούς. Οι παραπάνω μελέτες έδειξαν ότι η αυξημένη απορρόφηση νατρίου που



οφείλεται στον ENaC προκαλεί μείωση του υγρού των αεραγωγών, παχύρρευστη βλέννη και ελάττωση της βλεννοκροσσωτής κάθαρσης και κατ' επέκταση επάγει πνευμονική νόσο όμοια με την ασθένεια των πνευμόνων στην ΚΙ, που χαρακτηρίζεται από λοιμώξεις, φλεγμονή και διαταραχή της δομής του πνεύμονα. Ο κλασικός αναστολέας του ENaC, η αμιλορίδη, έχει δοκιμαστεί σε κλινικές δοκιμές σε εισπνεόμενη μορφή αλλά δε φάνηκε να βελτιώνει την πνευμονική λειτουργία σε ασθενείς με ΚΙ και εδραιωμένη πνευμονική νόσο, πιθανώς λόγω της χαμηλής ισχύος και του μικρού χρόνου ημίσειας ζωής στο αναπνευστικό επιθήλιο. Ωστόσο, όταν η αμιλορίδη δοκιμάστηκε σε προκλινικές δοκιμές ως αγωγή πρόληψης σε ποντίκια βENaC-Tg, φάνηκε ότι είχε σημαντικές επιδράσεις στη φλεγμονή και στην απόφραξη των αεραγωγών από τη βλέννη, ενώ το συνολικό όφελος υπερέιχε της προληπτικής χρήσης υπέρτονων διαλυμάτων. Έτσι, φαίνεται ότι η αμιλορίδη μπορεί να παρουσιάσει όφελος σε ασθενείς με ΚΙ προάγοντας την πρόληψη πνευμονικής νόσου.<sup>(47)</sup>

## 3.2 Ενεργοποιητές διαύλων χλωρίου

### 3.2.1 Denufosal

Διάλυτοι ιόντων χλωρίου που ενεργοποιούνται από το ασβέστιο, διαφορετικοί από τη CFTR, εκφράζονται στο αναπνευστικό επιθήλιο και έτσι έχουν μελετηθεί ως πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι που θα αντισταθμίζουν την ελλιπή έκκριση ιόντων που οφείλεται σε διαταραχή της CFTR. Διέγερση των κυττάρων του αναπνευστικού *in vitro* ή του ρινικού επιθηλίου *in vivo* με αγωνιστές ασβεστίου (ATP ή UTP) οδήγησε σε μεγάλο βαθμό διέγερση της μεταφοράς χλωρίου. Αυτή η απόκριση οφείλεται στην ενεργοποίηση ενός διαύλου χλωρίου που εξαρτάται από το ασβέστιο διαφορετικού από τη CFTR, καθώς εμφανίστηκε και σε ασθενείς με ΚΙ. Το denufosal είναι ένα εισπνεόμενο ανάλογο της UTP που επάγει την αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ασβεστίου όταν δεσμεύεται σε πουρινεργικούς υποδοχείς (P2Y2) που βρίσκονται στην κορυφαία επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων.<sup>(47)</sup> Ωστόσο, το denufosal δε βρέθηκε ότι βελτιώνει την πνευμονική λειτουργία ή ότι μειώνει τις παροξύνσεις σε ασθενείς με ΚΙ που έλαβαν μέρος σε κλινικές δοκιμές φάσης III.<sup>(51)</sup> Τα αίτια της αποτυχίας του denufosal δεν είναι καλά καθορισμένα, αλλά πιθανολογείται ότι ευθύνεται ο μικρός χρόνος ημίσειας ζωής του φαρμάκου λόγω ταχείας απενεργοποίησής του από εξωνουκλεοτιδάσες στο αναπνευστικό επιθήλιο.<sup>(52)</sup>

### 3.2.2 THEM16A

Η πρωτεΐνη THEM16A, γνωστή και ως anoctamin-1 (ANO1), είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά ιόντων χλωρίου που ενεργοποιείται από το ασβέστιο σε πολλούς τύπους κυττάρων. Η THEM16A ανήκει σε μία οικογένεια πρωτεϊνών που περιλαμβάνει δέκα μέλη, αλλά κυρίως η THEM16A παρουσιάζει έκφραση και δράση στα επιθηλιακά κύτταρα. Αποσιώπηση της έκφρασης της THEM16A σε καλλιέργειες κυττάρων ή knockout του γονιδίου της σε ποντίκια, οδήγησε σε σημαντικά μειωμένη έκκριση χλωρίου στο επιθήλιο. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η έκφραση της THEM16A ελέγχεται από προφλεγμονώδεις διεγέρσεις. Θεραπεία με τις κυτταροκίνες IL-4 και IL-3 σε καλλιέργειες κυττάρων αναπνευστικού επιθηλίου ή επαγωγή συνθηκών άσθματος σε ποντίκια αύξησε την έκφραση της THEM16A.<sup>(47)</sup> Η THEM16A βρίσκεται κυρίως στη μεμβράνη των κυττάρων goblet, τα οποία παράγουν βλέννη, και η εντόπισή της αυτή φαίνεται να συνδέεται με την υπερέκκριση βλέννης, που παρατηρείται στην Th2 ανοσιακή απόκριση στο αναπνευστικό σύστημα. Έτσι, η εντόπιση της THEM16A στα κύτταρα goblet και της CFTR στα κροσσωτά κύτταρα πιθανότατα υποδεικνύει ότι οι δύο πρωτεΐνες έχουν διαφορετικές λειτουργίες στην έκκριση βλέννης και κατ' επέκταση στην κάθαρση της βλέννης από τους αεραγωγούς.<sup>(53)</sup> Ενεργοποιητές της THEM16A φαίνεται να διεγείρουν τη μεταφορά ιόντων και με αυτόν τον τρόπο να προάγουν την απελευθέρωση βλεννίνης από τα κύτταρα goblet και να βελτιώνουν τη βλεννοκροσσωτή κάθαρση. Περαιτέρω επιδράσεις της THEM16A αναδείχθηκαν από μία μελέτη στην οποία η απώλεια της CFTR βρέθηκε να επάγει μια προφλεγμονώδη κατάσταση που χαρακτηρίζεται από υπερέκκριση IL-8, αλλά η διέγερση της μεταφοράς ιόντων μέσω ενεργοποιητών της THEM16A διόρθωσε το έλλειμμα.<sup>(54)</sup> Τέλος, είναι σημαντικό να επιτευχθεί επιλεκτική ρύθμιση της THEM16A στο αναπνευστικό επιθήλιο, ώστε να αποφευχθεί ο βρογχόσπασμος που θα μπορούσε να προκληθεί από ενεργοποίηση του διαύλου στα λεία μυϊκά κύτταρα.<sup>(47)</sup>

### 3.2.3 SLC26A9

Η πρωτεΐνη SLC26A9 ανήκει στην οικογένεια διαλυτών μεταφορέων ανιόντων 26 (SLC26), η οποία εκφράζεται στα επιθήλια των πνευμόνων και του στομάχου και λειτουργεί ως διάυλος χλωρίου, με μικρή συμμετοχή μεταφοράς διττανθρακικών. Η δομή της SLC26A9 περιλαμβάνει 12 διαμεμβρανικές περιοχές, που συμμετέχουν στο σχηματισμό του πόρου του διαύλου χλωρίου και μία περιοχή STAS στο καρβοξυτελικό άκρο, μέσω της οποίας η SLC26A9 μπορεί να αλληλεπιδράσει με τη CFTR και με τις WNK πρωτεϊνικές κινάσες με έλλειψη λυσίνης. Οι κινάσες αυτές εμπλέκονται στη ρύθμιση διάφορων μεταφορέων ιόντων

και διαύλων οι οποίοι ενέχονται στη ρύθμιση της ώσμωσης των επιθηλιακών κυττάρων. Επίσης έχει βρεθεί ότι η SLC26A9 συνεισφέρει στην έκκριση χλωρίου που εξαρτάται από το cAMP σε ανθρώπινα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα, γεγονός που υποδεικνύει ότι μπορεί να αποτελέσει εναλλακτικό δίαυλο ιόντων χλωρίου που ισοσταθμίζει τη δυσλειτουργία της CFTR.<sup>(47)</sup> Μελέτες σε ποντίκια με δυσλειτουργική CFTR και έλλειψη SLC26A9 υπέδειξαν αύξηση των ποσοστών θνησιμότητας που σχετίζονται με απόφραξη του γαστρεντερικού, αναδεικνύοντας τη σημασία της SLC26A9. Επιπλέον, σε πειραματικά μοντέλα ποντικών με άσθμα φάνηκε πως η λειτουργία της SLC26A9 αυξάνεται στην Th2 ανοσιακή απόκριση κατόπιν φλεγμονής των αεραγωγών, ενώ συνοδεύεται από μεταπλασία των κυττάρων goblet και υπερέκκριση βλέννης. Ακόμη έχει φανεί ότι ένας λειτουργικός μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) στο γονίδιο της SLC26A9, ο rs2282430, σχετίζεται με την εμφάνιση άσθματος σε παιδιά. Αυτός ο πολυμορφισμός βρίσκεται στην 3'αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου της SLC26A9, όπου σχηματίζει μία θέση πρόσδεσης για ένα microRNA, το has-miRNA632. Η πρόσδεση αυτού του microRNA στην 3'UTR έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης SLC26A9, γεγονός που οδηγεί στη μείωση της λειτουργίας του διαύλου χλωρίου *in vivo*.<sup>(55)</sup> Επιπλέον πολυμορφισμοί που σχετίζονται με αλλαγή στη λειτουργία της SLC26A9 έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς με ΚΙ, ενώ άλλοι πολυμορφισμοί της SLC26A9 σχετίζονται με την εμφάνιση ειλεού από μηκόνιο και πρόιμη εκδήλωση ανεπάρκειας της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος σε ασθενείς με ΚΙ. Όλα τα παραπάνω δεδομένα αναδεικνύουν τη SLC26A9 ως πιθανό θεραπευτικό στόχο, με σκοπό την αύξηση της έκκρισης ιόντων χλωρίου, της βλεννοκροσσωτής κάθαρσης και της ενυδάτωσης των αεραγωγών και του γαστρεντερικού σωλήνα σε ασθενείς με ΚΙ.<sup>(47)</sup>

## 4. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η γονιδιακή θεραπεία στην ΚΙ συνίσταται στη μεταφορά νουκλεϊκών οξέων που εκφράζουν τη CFTR πρωτεΐνη. Σε αυτήν την προσέγγιση, ένα λειτουργικό αντίγραφο του CFTR γονιδίου μεταφέρεται στα κύτταρα με στόχο την αναπαραγωγή του και τη δημιουργία λειτουργικών αντιγράφων. Παρόλα αυτά η μεταφορά του γονιδίου στους πνεύμονες είναι δύσκολη εξαιτίας εξωκυττάρων φραγμών, όπως η βλέννη, η βλεννοκροσσωτή κάθαρση και οι ανοσιακές αποκρίσεις, και ενδοκυττάρων φραγμών, όπως η πυρηνική μεμβράνη. Για τη μεταφορά του γονιδίου στα κύτταρα χρησιμοποιούνται ιικοί και μη-ιικοί φορείς.<sup>(56)</sup>

### 4.1 Γονιδιακή θεραπεία με χρήση ιικών φορέων

Οι ιικοί φορείς έχουν τη δυνατότητα να διαμολύνουν τα κύτταρα με το γενετικό τους υλικό, αποφεύγοντας το ανοσιακό σύστημα του ξενιστή και επαναπρογραμματίζοντάς το με σκοπό την αναπαραγωγή του ιικού γονιδιώματος. Στη γονιδιακή θεραπεία χρησιμοποιούνται ανασυνδυασμένοι ιοί, ώστε να καθίστανται ασφαλείς.<sup>(56)</sup>

Ο ιός σχετιζόμενος με αδενοϊό (Adeno-associated virus, AAV) δοκιμάζεται σε μοντέλα ζώων με ΚΙ με σκοπό την αύξηση του τροπισμού του, τη μείωση της ανοσογονικότητάς του και την αύξηση των επιπέδων έκφρασης της CFTR στην πλασματική μεμβράνη. Αποτελέσματα μελετών υπέδειξαν ότι ο ορότυπος 6 (AAV6) ήταν ο περισσότερο αποτελεσματικός σε επιθήλια ανθρώπου και ποντικού. Ο ορότυπος AAV2/5, δηλαδή το γενετικό υλικό του AAV2 συσκευασμένο σε πρωτεΐνες καψιδίου του AAV5, ήταν επίσης αποτελεσματικός σε ανθρώπινα κύτταρα *in vitro* και στο αναπνευστικό επιθήλιο ποντικών *in vivo*.<sup>(57)</sup> Η χρήση του AAV2/5, που εκφράζει ένα μικρότερο γονίδιο της CFTR, το CFTRDR, μαζί με έναν υποκινητή, τον CMV173, φάνηκε να αποκαθιστά πλήρως τη δραστηριότητα του διαύλου σε οργανοειδή εντερικά κύτταρα ασθενών με ΚΙ και σε κύτταρα ρινικού επιθηλίου ποντικών.<sup>(58)</sup>

Μία εναλλακτική προσέγγιση αποτελεί η χρήση του καψιδίου του ανθρώπινου Boca-ιού τύπου I (HBoV1) για τη συσκευασία του γενετικού υλικού του AAV2. Ο HBoV1 είναι ένας ιός γαργου που εμφανίζει υψηλό τροπισμό για την κορυφαία μεμβράνη των κυττάρων του ανθρώπινου αναπνευστικού επιθηλίου, ενώ έχει μεγαλύτερο καψίδιο από τον AAV.<sup>(57)</sup>

Οι λεντιοί έχουν την ικανότητα να ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του ξενιστή, με αποτέλεσμα τη συνεχή έκφραση των γονιδίων που φέρουν, καθώς επίσης μπορούν να συσκευάσουν ολόκληρο το γονίδιο της CFTR μαζί με υποκινητή. Ωστόσο, δεν εμφανίζουν φυσικό τροπισμό για το αναπνευστικό σύστημα και χρειάζεται η συσκευασία τους με κατάλληλες πρωτεΐνες φακέλου για τη μεταφορά τους. Επιπλέον, έχουν χρησιμοποιηθεί μοντέλα με τον ιό της ανοσοανεπάρκειας των αιλουροειδών (feline immunodeficiency virus, FIV) σε πρωτεϊνικό φάκελο baculo ιού (GP64) στο αναπνευστικό επιθήλιο γουρουνιών με ΚΙ,

με αποτέλεσμα λειτουργική CFTR.<sup>(59)</sup> Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ο ιός της ανοσοανεπάρκειας του πιθήκου σε πρωτεϊνικό φάκελο με την πρωτεΐνη F και HN του ιού Sendai σε καλλιέργειες ανθρώπινων βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων, όπου δεν παρατηρήθηκαν ανοσιακές αποκρίσεις.<sup>(60)</sup>

#### 4.2 Γονιδιακή θεραπεία με χρήση μη-υκών φορέων

Η χρήση λιποσωμικών φορέων στη γονιδιακή θεραπεία είναι ασφαλής και προσφέρει τη δυνατότητα συσκευασίας μεγάλων μορίων DNA, ενώ επιτρέπει την επαναλαμβανόμενη χορήγηση. Σε μία κλινική δοκιμή φάσης Ib, η χορήγηση του σχηματισμού γονιδίου-λιποσώματος pGM169/GL67A με νεφελποίηση εμφάνισε μικρή αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση της πνευμονικής λειτουργίας, αλλά ανέδειξε την ανάγκη βελτιωμένης μεταφοράς νουκλεϊκών οξέων.<sup>(61)</sup>

DNA νανομόρια από βιοαποδομήσιμα πολυμερή, οι πολυ(β-αμινοεστέρες) (PBAEs), που καλύπτονται από πυκνό στρώμα πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG), εμφάνισαν αυξημένη διεισδυτικότητα *in vitro* διαμέσου των νανοπόρων και του στρώματος βλέννης που αποτελούν τον πρωτογενή φραγμό για το υποκείμενο επιθήλιο. Επιπλέον, αυτά τα μόρια οδήγησαν σε αυξημένη έκφραση των διαγονιδίων στους πνεύμονες ποντικών *in vivo*.<sup>(62)</sup> Εξωκυττάρια κυστίδια και εξωσώματα χρησιμοποιήθηκαν επίσης ως φορείς για τη μεταφορά εξωγενούς γλυκοπρωτεΐνης CFTR και του mRNA της CFTR σε κύτταρα με ΚΙ. Η ενσωμάτωση των μικροκυστιδίων ή εξωσωμάτων σε ρινικά επιθηλιακά κύτταρα ομόζυγα για τη μετάλλαξη ΔF508del, οδήγησε σε αποκατάσταση της λειτουργικότητας της CFTR με δόσοεξαρτώμενο τρόπο.<sup>(63)</sup>

Το minicircle DNA αποτελεί μία προσέγγιση βελτίωσης της μεταφοράς νουκλεϊκών οξέων από νανομόρια. Αποτελεί κυκλικό τμήμα DNA που περιέχει διαγονίδια και ρυθμιστικά στοιχεία, ενώ έχουν αφαιρεθεί όλα τα ίχνη βακτηριακού DNA. Η μεταφορά τους σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα *in vitro* και σε επιθηλιακά κύτταρα ποντικού *in vivo* είχε ως αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα έκφρασης και μεγαλύτερη διάρκεια έκφρασης, καθώς και μειωμένη φλεγμονώδη απόκριση.<sup>(64)</sup>

Μόρια mRNA χημικά τροποποιημένα αναπτύχθηκαν ως έμμεσος τρόπος υποκατάστασης της CFTR πρωτεΐνης με μεταφορά τους στους πνεύμονες. Το mRNA προσφέρει υψηλότερα επίπεδα παραγωγής πρωτεΐνης και παρουσιάζει μεγαλύτερη ασφάλεια σε σχέση με τη μεταφορά του DNA του γονιδίου, αφού δεν εμφανίζει κίνδυνο χρωμοσωμικής ενσωμάτωσης. Η μεταφορά του mRNA διαμέσου του επιθηλιακού φραγμού απαιτεί τη χρήση λιποσωμικών ή πολυμερών μη-υκών φορέων. Τα μόρια mRNA έχουν μικρό χρόνο ημίσειας ζωής στους

πνεύμονες και γι' αυτό απαιτείται τακτική, επαναλαμβανόμενη χορήγησή τους για τη διατήρηση των επιπέδων έκφρασης της CFTR.<sup>(57)</sup>

## 5. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ

Η γονιδιακή τροποποίηση (genome editing) είναι μία νέα τεχνική που στοχεύει στη διόρθωση της γενετικής βλάβης σε επίπεδο DNA, σε σύγκριση με τη γονιδιακή θεραπεία στην οποία ένα νέο λειτουργικό γονίδιο μεταφέρεται μέσα στα κύτταρα ώστε να αντικαταστήσει τη γενετική βλάβη. Η επιδιόρθωση του ελαττωματικού DNA στην αρχική του θέση παρέχει το πλεονέκτημα του ελέγχου του γονιδίου από τον ενδογενή υποκινητή, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η συνεχής έκφραση και η ρύθμιση του γονιδίου από τους φυσιολογικούς μηχανισμούς. Επιπλέον η γενετική διόρθωση παρέχει τη δυνατότητα αποφυγής συμμετοχής ξένου DNA, ανάλογα με το φορέα μεταφοράς, μειώνοντας τον κίνδυνο μεταλλαξιγένεσης μέσω ενσωμάτωσης.<sup>(56)</sup> Με τη γενετική τροποποίηση μπορούν να επιδιορθωθούν συγκεκριμένες μεταλλάξεις της CFTR ή να αποσιωπηθούν κωδικές αλληλουχίες γονιδίων που συνεισφέρουν στη νόσο, όπως του ENaC. Οι υπάρχουσες τεχνολογίες με χρήση νουκλεασών εισάγουν αρχικά στοχευμένα σημεία θραύσης στο δίκλωνο DNA (double strand breaks, DSBs) κοντά στη χρωμοσωμική περιοχή της μετάλλαξης, οι οποίες στη συνέχεια επιδιορθώνονται από τους ενδογενείς μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, όπως τη μη ομόλογη σύνδεση άκρων (Non-Homologous End-Joining, NHEJ) και την ομόλογη επιδιόρθωση (Homology Directed Repair, HDR).<sup>(58)</sup> Η τροποποίηση του γονιδιώματος χρησιμοποιεί νουκλεάσες ή «μοριακά ψαλίδια», όπως τις ZFNs (Zinc Finger Nucleases), τις TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) και τις CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Inter-spaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR- Associated), με τις τελευταίες να θεωρούνται ως οι πιο αποτελεσματικές, καθώς είναι λιγότερο χρονοβόρες και έχουν χαμηλότερο κόστος.<sup>(56)</sup>

Η τεχνολογία της CRISPR/Cas9 χρησιμοποιεί ένα μόριο RNA-οδηγού (guide RNA, gRNA), το οποίο έχει την ίδια αλληλουχία με τον επιθυμητό γενετικό τόπο, και τη νουκλεάση Cas9. Όταν το gRNA εκφράζεται στο κύτταρο, συνδέεται με την Cas9 και την οδηγεί στην αλληλουχία-στόχο λόγω της συμπληρωματικότητας των βάσεων. Η Cas9 κόβει το δίκλωνο DNA στα επιθυμητά σημεία και ενεργοποιεί τους ενδογενείς μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Ο μηχανισμός NHEJ δρα γρηγορότερα και αποτελεσματικά ενώνοντας τα σπασμένα άκρα χωρίς την ανάγκη ομόλογου εκμαγείου. Ωστόσο, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα δημιουργίας ενθέσεων ή ελλείψεων (indels) στα DSBs. Εναλλακτικά, ο μηχανισμός HDR απαιτεί την παρουσία ομόλογης αλληλουχίας DNA, ενώ ως εκμαγείο μπορούν να χρησιμοποιηθούν πλασμίδια ή μονόκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια, ώστε να επιδιορθωθούν τα DSBs με υψηλή πιστότητα.<sup>(56)</sup>

Σε μία εφαρμογή της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες ανθρώπινων εντερικών βλαστικών κυττάρων, τα οποία προέρχονταν από ασθενείς με ΚΙ.

Αυτά τα κύτταρα χαρακτηρίζονταν από απουσία ικανότητας να εμφανίζονται οιδηματώδη μετά από αύξηση του cAMP, μορφολογία που φυσιολογικά παρατηρείται λόγω ανοίγματος της CFTR. Μετά από γονιδιακή τροποποίηση του γενετικού τόπου της CFTR με χρήση της CRISPR/Cas9 τεχνολογίας και ομόλογο ανασυνδυασμό, η πρωτεΐνη εκφραζόταν και ήταν πλήρως λειτουργική.<sup>(65)</sup>

Μία άλλη εφαρμογή του συστήματος CRISPR/Cas9 χρησιμοποίησε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs), που προήλθαν από επαναπρογραμματισμό ινοβλαστών του δέρματος από ασθενείς με KI, ομόζυγους για τη μετάλλαξη ΔF508del. Η επιδιόρθωση του γενετικού τόπου της CFTR στα κύτταρα αυτά μέσω της CRISPR/Cas9 οδήγησε στη διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών σε ώριμα επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής οδού, τα οποία εμφάνισαν φυσιολογική έκφραση και λειτουργικότητα της CFTR.<sup>(66)</sup>

Οι ZFNs χρησιμοποιήθηκαν σε κυτταρικές σειρές από iPSCs προερχόμενα από ινοβλάστες του δέρματος ασθενών με KI. Οι ZFNs σχεδιάστηκαν ώστε να στοχεύουν το CFTR γονίδιο και να διορθώνουν τη γενετική μετάλλαξη μέσω HDR. Όταν τα διορθωμένα για τη μετάλλαξη της KI iPSCs επάχθηκαν ώστε να διαφοροποιηθούν *in vitro*, παρατηρήθηκε αποκατάσταση της έκφρασης της ώριμης γλυκοζυλιωμένης CFTR πρωτεΐνης και διόρθωση της λειτουργίας του διαύλου χλωρίου στα επιθηλιακά κύτταρα που προήλθαν από τα iPSCs.<sup>(67)</sup>

Μία άλλη εφαρμογή των ZFNs στη γονιδιακή τροποποίηση περιλαμβάνει θεραπεία με «υπερ-εξώνιο» (“super-exon”). Οι ZFNs χρησιμοποιήθηκαν για να εισάγουν ένα τμήμα cDNA του CFTR γονιδίου, που καλύπτει τα εξώνια 11 έως 27 και αποτελεί το υπερ-εξώνιο, στο εξώνιο 11 επιθηλιακών κυττάρων αναπνευστικής οδού που έφεραν τη μετάλλαξη ΔF508del. Η ενσωμάτωση του υπερ-εξωνίου οδήγησε στην έκφραση διορθωμένου mRNA από τον ενδογενή υποκινητή του CFTR και αποκατέστησε τη μεταφορά ιόντων μέσω του διαύλου στην καλλιέργεια κυττάρων. Επομένως φαίνεται ότι η ενσωμάτωση ενός υπερ-εξωνίου της CFTR στο εξώνιο 11 οδηγεί σε λειτουργική διόρθωση της CFTR, υποδεικνύοντας ότι αυτή η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διόρθωση μεταλλάξεων της CFTR που εδράζονται downstream του 5' άκρου του εξωνίου 11.<sup>(68)</sup>

Εφαρμογή γονιδιακής τροποποίησης χωρίς τη χρήση νουκλεασών αποτελεί η προσέγγιση με τρισδιάστατα πεπτιδικά νουκλεϊκά οξέα (Peptide Nucleic Acids, PNAs). Τα PNAs χρησιμοποιήθηκαν για να στοχεύσουν και να επιδιορθώσουν τη μετάλλαξη ΔF508del της CFTR. Μεταφέρθηκαν με πολυμερή νανομορία, επιτυγχάνοντας διόρθωση της CFTR σε 25% των ανθρώπινων κυττάρων βρογχικού επιθηλίου *in vitro*. Ενδορρινική χορήγηση νανομορίων σε ποντίκια με KI οδήγησε σε διορθωμένη λειτουργία της CFTR *in vivo*, που αξιολογήθηκε



μέσω της διαφοράς δυναμικού του ρινικού επιθηλίου. Έτσι, η διόρθωση του γονιδίου εντοπίστηκε στο ρινικό και πνευμονικό ιστό, ενώ με αλληλούχιση φάνηκαν αμελητέες off-target επιδράσεις σε μερικώς ομόλογες περιοχές.<sup>(69)</sup>

Μία άλλη μέθοδος γονιδιακής τροποποίησης χωρίς χρήση νουκλεασών περιγράφει τη χρήση αδενοϊκών φορέων που εξαρτώνται από βοηθητικό ιό (helper- dependent Adenoviral vector, HDAdv). Οι HDAdv είναι κενοί από ιική κωδική αλληλουχία, έχουν μεγάλη κλωνική χωρητικότητα και μπορούν να μολύνουν αποτελεσματικά ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών τύπων ανεξάρτητα από τον κυτταρικό κύκλο. Οι HDAdv εμφανίζουν μεγάλη αποτελεσματικότητα γονιδιακής τροποποίησης σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs), χωρίς τη χρήση νουκλεασών, με αποτέλεσμα την αποφυγή off-target σημείων θραύσης. Η χρήση HDAdvs που φέρουν DNA με περιοχές ομόλογες με το γενετικό τόπο της CFTR μήκους πάνω από 20kb σε iPSCs με KI, οδήγησε σε επίπεδα διόρθωσης άνω του 50%, μετά από θετική επιλογή για την ενσωμάτωση του φορέα.<sup>(70)</sup>

## 6. ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Το λευκοτριένιο B4 (LTB<sub>4</sub>) είναι ένα κύτταρο του ανοσιακού συστήματος που παίζει ρόλο στη χημειοταξία και εμπλέκεται στην έναρξη των καταρρακτών κυτταροκινών και χημειοκινών που προάγουν τη φλεγμονή. Παράγεται από το λευκοτριένιο A4 (LTA<sub>4</sub>) από το ένζυμο υδρολάση του A4 λευκοτριενίου (LTA<sub>4</sub>H). Η αναστολή της LTA<sub>4</sub>H μπορεί να μειώσει την παραγωγή του LTB<sub>4</sub>, οδηγώντας σε μείωση της συγκέντρωσης ουδετερόφιλων και απελευθέρωσης ενζύμων, όπως η ελαστάση των ουδετεροφίλων. Το acebilustat είναι ένα μόριο που χορηγείται από το στόμα μία φορά ημερησίως και παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση αναστέλλοντας την LTA<sub>4</sub>H και ρυθμίζοντας το LTB<sub>4</sub>. Έχει τη δυνατότητα να μειώσει την επιδείνωση της πνευμονικής λειτουργίας και τον αριθμό των πνευμονικών παροξύνσεων σε ασθενείς με ΚΙ. Σε δύο κλινικές δοκιμές φάσης I, το acebilustat μείωσε την παραγωγή LTB<sub>4</sub> και άλλους φλεγμονώδεις δείκτες σε υγιείς και ασθενείς με ΚΙ. Στη μελέτη EMPIRE-CF, πολυκεντρική κλινική δοκιμή φάσης II, με χρήση placebo, λαμβάνουν μέρος ασθενείς ηλικίας από 18 έως 30 έτη, με FEV<sub>1</sub>(pp)≥50% και μία ή περισσότερες πνευμονικές παροξύνσεις το τελευταίο έτος. Τα κύρια τελικά σημεία της μελέτης περιλαμβάνουν τον έλεγχο της πνευμονικής λειτουργίας, τον αριθμό των πνευμονικών παροξύνσεων και το χρόνο που μεσολαβεί μέχρι την εμφάνιση της πρώτης πνευμονικής παρόξυνσης, ενώ αξιολογούνται επίσης οι δείκτες φλεγμονής και η ασφάλεια του φαρμάκου.<sup>(71)</sup>

Τα ρετινοειδή έχουν προταθεί επίσης ως αντιφλεγμονώδης θεραπεία στην ΚΙ, καθώς προάγουν την ομοίωση της εξωκυττάριας ουσίας. Το LAU-7b είναι μια χορηγούμενη από το στόμα στερεά φαρμακομορφή του ρετινοϊκού φενρετινίδη. Μελέτες φάσης Ib δείχνουν ότι είναι ασφαλές και καλά ανεκτό και αναμένεται η σύσταση κλινικών δοκιμών φάσης II.<sup>(9)</sup>

Οι αγωνιστές των υποδοχέων των κανναβινοειδών 2 βρίσκονται στους κινητικούς νευρώνες και στα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος και είναι υπό διερεύνηση ως αντιφλεγμονώδεις παράγοντες στην ΚΙ, καθώς η ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Το Lenabasum είναι ένας από του στόματος εκλεκτικός αγωνιστής του υποδοχέα των κανναβινοειδών 2, ο οποίος μειώνει τη φλεγμονή που ενισχύεται από τα ουδετερόφιλα, αναστέλλοντας τον LTB<sub>4</sub> και ρυθμίζοντας το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος. Μία κλινική δοκιμή φάσης II σε ενήλικες με ΚΙ έδειξε μείωση των δεικτών φλεγμονής στα πτύελα και μείωση του αριθμού των παροξύνσεων, χωρίς σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες.<sup>(9)</sup>

## 7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η Κυστική Ίνωση αποτελεί μία από τις πιο κοινές γενετικές ασθένειες και έχει αποτελέσει σημείο αναφοράς στην προσέγγιση των θεραπευτικών επιλογών σε γενετικά καθοριζόμενες νόσους. Τα τελευταία χρόνια έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος όσον αφορά το προσδόκιμο επιβίωσης και την ποιότητα ζωής των ασθενών με ΚΙ. Η ΚΙ έχει μετατραπεί από μία θανατηφόρο ασθένεια της παιδικής ηλικίας σε μία χρόνια νόσο χάρη στις συμπτωματικές θεραπείες, που βελτιώνουν τα κλινικά συμπτώματα και τις συνθήκες ζωής, και τα νεότερα ρυθμιστικά μόρια, που προσανατολίζονται αιτιολογικά στη μοριακή βλάβη.

Αρχικά, οι συμπτωματικές θεραπείες αποτελούν μέχρι σήμερα τον ακρογωνιαίο λίθο στην αντιμετώπιση του κλινικού φαινότυπου της νόσου, ανεξάρτητα από το γονότυπο. Η χρήση εισπνεόμενων βλεννολυτικών, όπως οι ανασυνδυασμένες DNAάσες και τα υπέρτονα διαλύματα, βοηθάει στην παροχέτευση των αεραγωγών από τις παχύρρευστες εκκρίσεις, ενώ η χρήση αντιβιοτικών ευνοεί την πρόληψη και αντιμετώπιση των λοιμώξεων του αναπνευστικού. Για αυτό το λόγο το ενδιαφέρον στρέφεται γύρω από την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών σε μορφή νεφελοποίησης, ώστε να αποφεύγονται οι συστηματικές ανεπιθύμητες ενέργειες και να επιτυγχάνεται η εκρίζωση των παθογόνων, ιδίως αυτών που έχουν αναπτύξει ανοχή στα ήδη υπάρχοντα αντιβιοτικά, με κύριο στόχο την *Pseudomonas aeruginosa*. Απώτερος σκοπός των παραπάνω θεραπειών είναι η μείωση του αριθμού των πνευμονικών παροξύνσεων που συμβάλλουν στο φαύλο κύκλο της απόφραξης των αεραγωγών, της φλεγμονής και της λοίμωξης.

Η αποσαφήνιση του γενετικού υπόβαθρου της ΚΙ και των μηχανισμών που ενέχονται στην παραγωγή ελαττωματικής πρωτεΐνης οδήγησε στην κατηγοριοποίηση των γενετικών πολυμορφισμών σε ομάδες ανάλογα με την πρωταρχική βλάβη σε μοριακό επίπεδο. Η ανάπτυξη των ρυθμιστών διαύλων ιόντων στοχεύει στην αποκατάσταση της αρχικής βλάβης και κατ' επέκταση στη μεταφορά ιόντων χλωρίου διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης. Αρχικά, το ρυθμιστικό μόριο ivacaftor, που ανήκει στην κατηγορία των ενισχυτών, εμφάνισε σημαντικά αποτελέσματα χρησιμοποιούμενο σε ασθενείς με ΚΙ που έφεραν τη μετάλλαξη Gly551Asp. Σειρά κλινικών δοκιμών οδήγησαν στην έγκριση του ivacaftor από τον FDA για χρήση σε ασθενείς ηλικίας άνω των δύο ετών που φέρουν τουλάχιστον μία μετάλλαξη της ίδιας ομάδας με τη μετάλλαξη Gly551Asp, αυξάνοντας τον αριθμό σε συνολικά 38 μεταλλάξεις του CFTR γονιδίου. Το μόριο αυτό άνοιξε το δρόμο για θεραπείες κατευθυνόμενες από τις υποκείμενες μεταλλάξεις, οι οποίες στοχεύουν στην επιδιόρθωση του εκάστοτε ελλείμματος. Στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι επιδιορθωτές και φάνηκε πως σε

συνδυασμό με τους ενισχυτές παρουσιάζουν όφελος σε ασθενείς με την πιο κοινή μετάλλαξη, τη ΔF508del. Έτσι, ο συνδυασμός lumacaftor/ivacaftor έχει λάβει έγκριση από τον FDA ως θεραπεία της ΚΙ σε ασθενείς ομόζυγους για τη ΔF508del, ηλικίας 6 ετών και άνω. Κλινικές δοκιμές με χορήγηση ενός δεύτερου επιδιορθωτή, του tezacaftor, οδήγησαν επίσης σε κλινικό όφελος με αποτέλεσμα την έγκριση του συνδυασμού tezacaftor/ivacaftor από τον FDA ως θεραπεία σε ασθενείς ηλικίας 12 ετών και άνω, ομόζυγους για τη μετάλλαξη ΔF508del ή ετερόζυγους για τη ΔF508del μαζί με μια μετάλλαξη που οδηγεί σε υπολειπόμενη λειτουργία της CFTR.

Παρά το μέτριο κλινικό όφελος για τους ασθενείς με ΚΙ που φέρουν τη ΔF508del, τα αποτελέσματα από τη συνδυαστική χρήση επιδιορθωτών/ενισχυτών δεν είναι εφάμιλλα με αυτά της μονοθεραπείας με ivacaftor σε ασθενείς με μεταλλάξεις υπολειπόμενης λειτουργικότητας. Προς αυτήν την κατεύθυνση μελετώνται μοντέλα συνεργικότητας προς ενίσχυση του αποτελέσματος. Η χρήση τριπλού συνδυασμού επιδιορθωτών σε συνδυασμό με έναν ενισχυτή, ώστε να επιτευχθεί αθροιστική και συνεργική δράση που οδηγεί στα επιθυμητά επίπεδα λειτουργικής πρωτεΐνης, αποτελεί μία τέτοια προσέγγιση. Επίσης, μία νέα κατηγορία ρυθμιστικών μορίων, οι amplifiers, αυξάνει την έκφραση της πρώιμης CFTR πρωτεΐνης σε διαφορετικούς τύπους μεταλλάξεων του γονιδίου. Έτσι, αυξάνεται η ποσότητα της CFTR πρωτεΐνης, η οποία υπόκειται στη δράση των υπόλοιπων ρυθμιστικών μορίων.

Επιπλέον, υπό διερεύνηση βρίσκεται η χρήση αντικωδικών ολιγονουκλεοτιδίων. Σε αυτήν την προσέγγιση χρησιμοποιούνται αντινοσηματικές αλληλουχίες με σκοπό την αποφυγή του εναλλακτικού ματίσματος και την επαναφορά του στο φυσιολογικό.

Ωστόσο, παρά την πρόοδο που σημειώθηκε στις στοχευμένες για διάφορους τύπους μεταλλάξεων θεραπείες, παραμένουν μεταλλάξεις οι οποίες δεν αποκρίνονται σε αυτές τις στρατηγικές. Έχουν προταθεί λοιπόν εναλλακτικές θεραπευτικές προσεγγίσεις, ανεξάρτητες από τον τύπο μετάλλαξης. Μία από αυτές αφορά εναλλακτικούς διαύλους ιόντων, διαφορετικούς της CFTR, οι οποίοι θα είναι σε θέση να αναπληρώσουν τη διακίνηση ιόντων που προκύπτει από το έλλειμμα της CFTR. Η αναστολή ενεργοποίησης του διαύλου νατρίου και η ενεργοποίηση του διαύλου χλωρίου με τη βοήθεια διάφορων μορίων έχει δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα και νέα μόρια βρίσκονται υπό διερεύνηση για τη βελτιστοποίηση της στρατηγικής αυτής.

Η γονιδιακή θεραπεία αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό μοντέλο και συνίσταται στη μεταφορά ενός λειτουργικού αντίγραφου του CFTR γονιδίου στα κύτταρα με στόχο την αναπαραγωγή του και τη δημιουργία λειτουργικών αντιγράφων. Παρόλα αυτά η μεταφορά του γονιδίου στους πνεύμονες είναι δύσκολη εξαιτίας εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων φραγμών. Για τη μεταφορά του γονιδίου στα κύτταρα χρησιμοποιούνται ιικοί και μη-ιικοί

φορείς και η πρόκληση για το μέλλον είναι η χρήση των κατάλληλων φορέων οι οποίοι θα διαπερνούν τους φυσιολογικούς φραγμούς, θα επιτυγχάνουν το επιθυμητό θεραπευτικό αποτέλεσμα, θα έχουν αποδεκτό προφίλ ασφάλειας, τροπισμό για τον υπό θεραπεία ιστό και εύκολο σχήμα χορήγησης.

Επιπρόσθετα, η τεχνική της γενετικής τροποποίησης με χρήση νουκλεασών κερδίζει συνεχώς έδαφος. Η γενετική τροποποίηση στοχεύει στη διόρθωση της γενετικής βλάβης σε επίπεδο DNA μέσω της οποίας μπορούν να επιδιορθωθούν συγκεκριμένες μεταλλάξεις της CFTR ή να αποσιωπηθούν κωδικές αλληλουχίες γονιδίων που συνεισφέρουν στη νόσο. Η τεχνολογία της CRISPR/Cas9 θεωρείται ως η πιο αποτελεσματική και βρίσκεται υπό διερεύνηση σε μοντέλα που χρησιμοποιούν καλλιέργειες βλαστικών κυττάρων.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, παράλληλα με την ανάπτυξη νέων συμπτωματικών θεραπειών, η έρευνα στρέφεται προς θεραπευτικές λύσεις προσανατολισμένες στο γενετικό υπόβαθρο της νόσου. Οι θεραπείες με τους ρυθμιστές διαύλων ιόντων στοχεύουν σε συγκεκριμένες ομάδες μεταλλάξεων, ενώ οι τεχνικές της γονιδιακής θεραπείας και γενετικής επιδιόρθωσης καθιστούν εφικτή τη διόρθωση συγκεκριμένης μετάλλαξης σε επίπεδο DNA. Η χρήση κυτταρικών μοντέλων, ειδικών για κάθε ασθενή, παρέχει τη δυνατότητα διαλογής της βέλτιστης θεραπευτικής επιλογής σε *in vitro* καλλιέργειες πριν την κλινική εφαρμογή. Έτσι, οι θεραπευτικές λύσεις στην ΚΙ κατευθύνονται προς εξατομικευμένα μοντέλα, τα οποία θα παρέχουν θεραπευτικές επιλογές ακόμα και για σπάνιες μεταλλάξεις.

## 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kym et al. (2018), Recent Progress in the Discovery and Development of Small-Molecule Modulators of CFTR, *Progress in Medical Chemistry*, 57(1):235-276.
2. Maiuri et al. (2017), Strategies for Etiological Therapy of Cystic Fibrosis, *Cell Death and Differentiation*, 24(11):1825-1844.
3. Fernandez et al. (2018), CFTR Dysfunction in Cystic Fibrosis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *Expert Review of Respiratory Medicine*, 12(6):483-492.
4. Kumar et al. (2014), Cystic Fibrosis - What Are the Prospects for a Cure?, *European Journal of Internal Medicine*, 25(9):803-807.
5. Hwang & Sheppard (2009), Gating of the CFTR Cl<sup>-</sup> Channel by ATP-driven Nucleotide-Binding Domain Dimerisation, *The Journal of Physiology*, 587(10):2151-2161.
6. O'Neal & Knowles (2018), Cystic Fibrosis Disease Modifiers: Complex Genetics Defines the Phenotypic Diversity in a Monogenic Disease, *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 19(7):1-22.
7. Cantin et al. (2015), Inflammation in Cystic Fibrosis Lung Disease: Pathogenesis and Therapy, *Journal of Cystic Fibrosis*, 14(4):419-430.
8. Κανακούδη-Τσακαλίδου et al. (2014), *Βασική Παιδιατρική*, University Studio Press, :377-380.
9. McElvaney et al. (2018), Emerging pharmacotherapies in cystic fibrosis, *Expert Review of Respiratory Medicine*. epublication ahead of print.
10. Bridges et al. (2018), Unique Challenges of Cystic Fibrosis-Related diabetes, *Diabetic Medicine*, epublication ahead of print.
11. Davison (2018), Assessment of Liver Disease in Cystic Fibrosis, *Paediatric Respiratory Reviews*, epublication ahead of print.
12. Debray et al. (2011), Best Practice Guidance for the Diagnosis and Management of Cystic Fibrosis-Associated Liver Disease, *Journal of Cystic Fibrosis*, 10(Supplement 2):S29-S36.
13. Green et al. (2018), Interventions for Treating Distal Intestinal Obstruction Syndrome (DIOS) in Cystic Fibrosis, *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
14. Houwen & Sathe (2017), Meconium Ileus in Cystic Fibrosis, *Journal of Cystic Fibrosis*, 16(Supplement 2):S32-S39.

15. Home page: National Library of Medicine (US), *Genetics Home Reference [Internet]*. Bethesda (MD). The Library; 2018 August 28 [reviewed 2008 January]. Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/congenital-bilateral-absence-of-the-vas-deferens#statistics>.
16. Mogayzel & Paranjape (2014), Cystic Fibrosis, *Pediatrics in Review*, 35(5):194-205.
17. Farrell et al. (2008), Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report, *The Journal of Pediatrics*, 153(2):S4-S14.
18. Elborn (2016), Cystic Fibrosis, *The Lancet*, 388(10059):2519-2531.
19. Ratchford et al. (2018), Gastrointestinal Pathophysiology and Nutrition in Cystic Fibrosis, *Expert Review of Gastrointestinal Pathophysiology and Hepatology*, epublication ahead of print.
20. Corris (2013), Lung Transplantation for Cystic Fibrosis and Bronchiectasis, *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 34(3):297-304.
21. Cutting (2014), Cystic Fibrosis Genetics: from Molecular Understanding to Clinical Application, *Nature Reviews Genetics*, 16(1):45-56.
22. Mall & Gentsch (2018), Ion Channel Modulators in Cystic Fibrosis, epub ahead of print.
23. Clancy et al. (2018), CFTR modulator theratyping: Current status, gaps and future directions, *Journal of cystic fibrosis*, S1569-1993(18):30585-X.
24. Crawford & Downey (2018), Theratyping in cystic fibrosis, *Current opinion in pulmonary medicine*, epublication ahead of print.
25. Brodlie et al. (2015), Targeted Therapies to Improve CFTR Function in Cystic Fibrosis, *Genome Medicine*, 7(1):101.
26. Corvol et al. (2016), Translating the Genetics of Cystic Fibrosis to Personalized Medicine, *Translational Research*, 168:40-49.
27. Clancy & Hudock (2017), An Update on New and Emerging Therapies for Cystic Fibrosis, *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 22(4):331-346.
28. Mutyam et al. (2017), Therapeutic benefit observed with the CFTR potentiator, ivacaftor, in a CF patient homozygous for the W1282X CFTR nonsense mutation, *Journal of cystic fibrosis*, 1(16):24-29.
29. Clancy et al. (2012), 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*, 67(1):12-18.
30. Wainwright et al. (2015), Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del-CFTR, *New England Journal of Medicine*, 373(18):220-231.

31. Rowe et al. (2017), Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Heterozygous for Phe508del-CFTR, *Annals of the American Thoracic Society*, 14(2):213-219.
32. Cholon et al. (2013), Potentiator Ivacaftor Impedes Pharmacological Correction of  $\Delta$ F508 CFTR, *Pediatric Pulmonology*, 6(246):246-296.
33. Taylor-Cousar et al. (2017), Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del, *New England Journal of Medicine*, 377(21):2024-2035.
34. Rowe et al. (2017), Tezacaftor-Ivacaftor in Residual-Function Heterozygotes with Cystic Fibrosis, *The New England Journal of Medicine*, 377(21):2034-2035.
35. Giuliano et al. (2018), Use of a High-Throughput Phenotypic Screening Strategy to Identify Amplifiers, a Novel Pharmacological Class of Small Molecules That Exhibit Functional Synergy with Potentiators and Correctors, *SLAS discovery: advancing life sciences R & D*, 23(2):111-121.
36. Molinski et al. (2017), Orkambi® and amplifier co-therapy improves function from a rare CFTR mutation in gene-edited cells and patient tissue, *EMBO molecular medicine*, 9(9):1224-1243.
37. Carlile et al. (2018), A novel triple combination of pharmacological chaperones improves F508del-CFTR correction, *Scientific reports*.
38. Ramsey et al. (2011), A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation, *The New England journal of medicine*, 365(18):1663-1672.
39. Davies et al. (2013), Efficacy and safety of ivacaftor in patients aged 6 to 11 years with cystic fibrosis with a G551D mutation, *American journal of respiratory and critical care medicine*, 187(11):1219-1225.
40. Rosenfeld et al. (2018), Ivacaftor treatment of cystic fibrosis in children aged 12 to <24 months and with a CFTR gating mutation (ARRIVAL): a phase 3 single-arm study, *The Lancet. Respiratory medicine.*, 6(7):545-553.
41. Sazani & Kole (2003), Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing, *The Journal of Clinical Investigation*, 112(4):481-486.
42. Friedman et al. (1999), Correction of aberrant splicing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by antisense oligonucleotides, *The journal of biological chemistry*, 274(51):36193-36199.
43. Igreja et al. (2016), Correction of a Cystic Fibrosis Splicing Mutation by Antisense Oligonucleotides, *Human Mutation*, 37(2):209-215.
44. Donaldson et al. (2017), Pharmacokinetics and safety of cavosonstat (N91115) in healthy and cystic fibrosis adults homozygous for F508DEL-CFTR, *Journal of cystic fibrosis*, 16(3):371-379.



45. Strug et al. (2018), Recent advances in developing therapeutics for cystic fibrosis, *Human molecular genetics*, 27(R2):R173-R186.
46. Myerburg & Lennox (2015), SPX-101 Is a Promising and Novel Nebulized ENaC Inhibitor, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 196(6):671-672.
47. Galiotta & Mall (2015), Targeting Ion Channels in Cystic Fibrosis, *Journal of Cystic Fibrosis*, 14(5):561-570.
48. Reihill et al. (2016), Inhibition of Protease-Epithelial Sodium Channel Signaling Improves Mucociliary Function in Cystic Fibrosis Airways, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 194(6):701-710.
49. Crosby et al. (2017), Inhaled ENaC Antisense Oligonucleotide Ameliorates Cystic Fibrosis-Like Lung Disease in Mice, *Journal of Cystic Fibrosis*, 16(6):671-680.
50. Gianotti et al. (2013), Epithelial Sodium Channel Silencing as a Strategy to Correct the Airway Surface Fluid Deficit in Cystic Fibrosis, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 49(3):445-452.
51. Ratjen et al. (2012), Long Term Effects of Denufosal Tetrasodium in Patients with Cystic Fibrosis, *Journal of Cystic Fibrosis*, 11(6):539-549.
52. Moss (2013), Pitfalls of Drug Development: Lessons Learned from Trials of Denufosal in Cystic Fibrosis, *The Journal of Pediatrics*, 162(4):676-680.
53. Sondo et al. (2014), The TMEM16A Chloride Channel as an Alternative Therapeutic Target in Cystic Fibrosis, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, (52):73-76.
54. Veit et al. (2012), Proinflammatory Cytokine Secretion is Suppressed by TMEM16A or CFTR Channel Activity in Human Cystic Fibrosis Bronchial Epithelia, *Molecular biology of the cell*, 23(21):4188-4202.
55. Anagnostopoulou et al. (2012), SLC26A9-Mediated Chloride Secretion Prevents Mucus Obstruction in Airway Inflammation, *The Journal of Clinical Investigation*, 122(10):3629-3634.
56. Marangi & Pistritto (2018), Innovative Therapeutic Strategies for Cystic Fibrosis: Moving Forward to CRISPR Technique, *Frontiers in Pharmacology*, 20(9):396.
57. Hart & Harrison (2017), Genetic therapies for cystic fibrosis lung disease, *Current opinion in pharmacology*, (34):119-124.
58. Vidović et al. (2016), rAAV-CFTR $\Delta$ R Rescues the Cystic Fibrosis Phenotype in Human Intestinal Organoids and Cystic Fibrosis Mice, *American journal of respiratory and critical care medicine*, 193(3):288-298.

59. Cooney et al. (2016), Lentiviral-mediated phenotypic correction of cystic fibrosis pigs, *JCI insight*, 1(14):e88730.
60. Alton et al. (2017), Preparation for a first-in-man lentivirus trial in patients with cystic fibrosis, *Thorax*, 72(2):137-147.
61. Alton et al. (2015), Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial, *The Lancet. Respiratory medicine*, 3(9):684-691.
62. Mastorakos et al. (2015), Highly compacted biodegradable DNA nanoparticles capable of overcoming the mucus barrier for inhaled lung gene therapy, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 112(28):8720-8725.
63. Vituret et al. (2016), Transfer of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator to Human Cystic Fibrosis Cells Mediated by Extracellular Vesicles, *Human gene therapy*, 27(2):166-183.
64. Munye et al. (2016), Minicircle DNA Provides Enhanced and Prolonged Transgene Expression Following Airway Gene Transfer, *Scientific reports*, 15(6):23125.
65. Schwank et al. (2013), Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients, *Cell stem cell*, 13(6):653-658.
66. Firth et al. (2015), Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs, *Cell reports*, 12(9):1385-1390.
67. Crane et al. (2015), Targeted correction and restored function of the CFTR gene in cystic fibrosis induced pluripotent stem cells, *Stem cell reports*, 4(4):569-577.
68. Bednarski et al. (2016), Targeted Integration of a Super-Exon into the CFTR Locus Leads to Functional Correction of a Cystic Fibrosis Cell Line Model, *PLoS One*, 11(8):e0161072.
69. McNeer et al. (2015), Nanoparticles that deliver triplex-forming peptide nucleic acid molecules correct F508del CFTR in airway epithelium, *Nature communications*, 6:6952.
70. Palmer et al. (2016), Homology Requirements for Efficient, Footprintless Gene Editing at the CFTR Locus in Human iPSCs with Helper-dependent Adenoviral Vectors, *Molecular therapy. Nucleic acid*, 5(10):e372.
71. Elborn et al. (2018), EMPIRE-CF: A phase II randomized placebo-controlled trial of once-daily, oral acebilustat in adult patients with cystic fibrosis - Study design and patient demographics, *Contemporary clinical trials*, 72:86-94.