UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie

ELABORATO DI LAUREA

Nuove terapie per la fibrosi cistica

Tutor: Prof.ssa Adriana Chilin
Dipartimento di Scienze del Farmaco

Laureanda: Sofia Rigato

ANNO ACCADEMICO 2024/2025

Indice

Introduzione 3
1-La Fibrosi Cistica 5
1.1-Gene CFTR e struttura della proteina codificata dallo stesso gene 5
1.2-Diagnosi 7
1.3-Le classi mutazionali responsabili di Fibrosi Cistica 8
1.4-I geni modificatori 8
1.5-Il concetto di portatore 9
1.6-Fisiopatologia 10
2-Alcune terapie standard 11
3-Terapie innovative: i modulatori CFTR 13
3.1-Il metabolismo dei modulatori CFTR 14
3.2-Effetti collaterali comuni da somministrazione di modulatori 15
3.3-Vanzacaftor 16
3.4-Tezacaftor 16
3.5-Ivacaftor 17
3.6-Deutivacaftor 17
4-Il processo di deuterazione 19
5-Il farmaco Alyftrek (vanzacaftor, tezacaftor, deutivacaftor) 21
6-Trial clinici 25
7-Utilizzo di cellule iPSC per il test di modulatori CFTR 29
Conclusione 31
Bibliografia 33

Introduzione

Il seguente elaborato presenta brevemente la Fibrosi Cistica, la fisiopatologia della malattia e le terapie più comuni utilizzate per alleviare i sintomi di pazienti con diverse mutazioni. Il tema principale su cui viene argomentata la tesi sono le terapie innovative per la Fibrosi Cistica, in particolare i modulatori CFTR: piccole molecole che si legano al canale difettivo con lo scopo di migliorarne la funzione, il trasporto o l'assemblaggio a seconda della categoria di modulatore. Viene descritto il metabolismo di queste molecole, i possibili effetti collaterali dovuti alla loro assunzione, la funzione in base alla loro classificazione specifica e le interazioni che queste molecole possono avere con altri farmaci o composti. Viene inoltre presentato il nuovo farmaco Alyftrek, combinazione dei tre modulatori vanzacaftor, tezacaftor e deutivacaftor approvato dall'FDA nel dicembre 2024 con i principali trial clinici ad esso associati per consentirne l'approvazione. Si parla infine delle cellule iPSC, utilizzate per il test degli stessi modulatori CFTR, e delle possibili scoperte future che consentiranno a questo tipo di terapia non solo di essere efficace per diversi pazienti con differenti mutazioni nel gene, ma che permettano anche alla terapia stessa di essere accessibile a tutti coloro che ne faranno uso.

Capitolo 1

La Fibrosi Cistica

La Fibrosi Cistica è la malattia genetica rara più diffusa nella popolazione caucasica che colpisce principalmente l'apparato respiratorio e digerente. Il gene che, se mutato, è responsabile della patologia è il gene CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), il quale codifica per una proteina di membrana con funzione di canale per lo ione cloruro.

Ci sono diverse mutazioni nel gene CFTR responsabili della Fibrosi Cistica, la più comune consiste nella delezione di tre nucleotidi con conseguente perdita dell'amminoacido fenilalanina in posizione 508, detta mutazione F508del. Questo porta ad uno scorretto ripiegamento della proteina che si inserisce in maniera anomala nella membrana plasmatica, si riduce il numero di ioni cloruro trasportati attraverso le cellule epiteliali e si riduce la quantità di acqua esportata dalle stesse cellule epiteliali per osmosi.

È una patologia che determina quindi la produzione di un muco eccessivamente denso nell'apparato respiratorio, digerente e riproduttivo; ha trasmissione autosomica recessiva e si stima che 1 bambino nato in Italia su 2.500-3.000 circa sia affetto.

Il rischio di ricorrenza, come per tutte le patologie autosomiche recessive, è del 25%: da due genitori eterozigoti c'è il 50% di probabilità che la prole sia omozigote sana, il 25% che la prole sia eterozigote e quindi portatrice, il 25% che la prole sia omozigote per l'allele mutato e quindi manifesti la patologia.

L'aspettativa di vita per un paziente affetto da Fibrosi Cistica ad oggi in Italia, grazie ai continui progressi delle cure e dell'assistenza, è attorno ai 40 anni.

1.1 Gene CFTR e struttura della proteina codificata dallo stesso gene

Il gene che codifica per la proteina è situato sul braccio lungo del cromosoma 7, è lungo circa 189 kb ed è composto da 27 esoni e 26 introni. La proteina CFTR è

costituita da 1480 amminoacidi e può essere strutturalmente suddivisa in diverse regioni:

- 2 regioni che ancorano la proteina alla membrana, MSD1 e MSD2
- 2 domini per nucleotidi detti NBD1 e NBD2 che interagiscono con ATP. La loro funzione è quella di controllare l'apertura del canale tramite il legame con 2 ATP e l'idrolisi di uno di essi, quando il canale si attiva NBD1 e 2 dimerizzano tra loro cambiando conformazione.
- 4 domini intracellulari ICD1-4
- Un'area contenente molti siti per la fosforilazione
- Regione regolatrice "R" che collega il primo dominio NBD al secondo intermembrana, per far sì che il canale sia attivo deve essere fosforilata

CFTR ha quindi attività ATP-asica, grazie all'uso di una molecola di ATP è in grado di trasportare secondo gradiente di concentrazione alcuni anioni, tra cui il cloro. Il passaggio del cloro determina uno spostamento in direzione opposta di sodio che a sua volta richiama acqua nel fluido extracellulare. I canali CFTR fanno parte della superfamiglia dei trasportatori ABC. La loro sintesi avviene nel reticolo endoplasmatico, in seguito a livello del Golgi la proteina subisce modifiche post-traduzionali e viene racchiusa in vescicole per raggiungere le membrane degli epiteli. CFTR è infatti espressa nella regione apicale delle cellule epiteliali secretorie localizzate in diversi organi, tra cui fegato, pancreas e pelle.

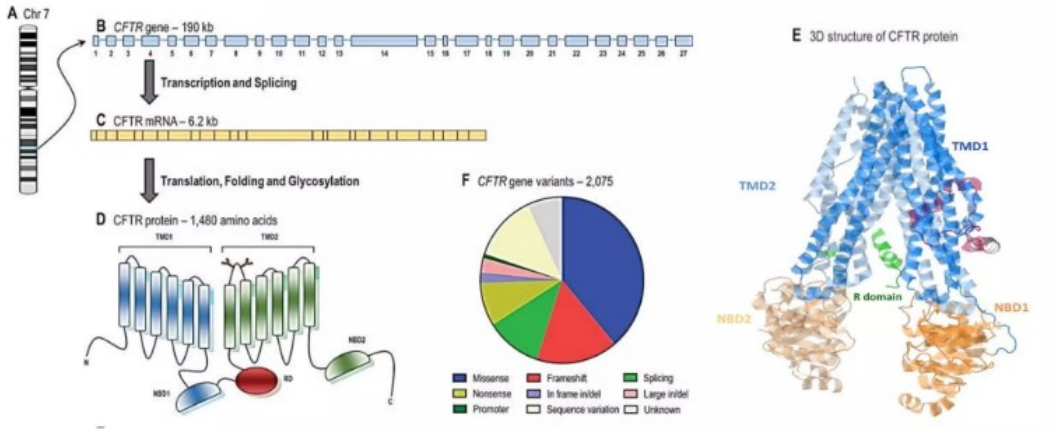

Figura 1.1: struttura del gene CFTR e della proteina da esso codificata con le varianti più comuni.

1.2 Diagnosi

Test del sudore: misura la concentrazione di sale nel sudore, se la concentrazione è superiore a 60 milliequivalenti di cloro per litro dopo i 6 mesi e 50 milliequivalenti nei primi mesi di vita il test risulta positivo per la diagnosi di Fibrosi Cistica. Test intermedi non sono conclusivi e richiedono il ricorso all'analisi genetica. Esistono vari metodi per effettuare il test del sudore ma il più affidabile è quello di Gibson e Cooke: si posizionano sull'avambraccio dei tamponi imbevuti di pilocarpina, che promuove la sudorazione, e attraverso una piccola scarica elettrica la sostanza è in grado di penetrare l'epidermide; dopo circa 5 minuti si rimuovono i tamponi, si lava la regione con H_2O sterile e si raccoglie il sudore attraverso carta da filtro o un tubo capillare.

Test NPD (*nasal potential difference*): misura il voltaggio attraverso l'epitelio nasale di sodio e cloro e quindi riflette parzialmente la funzionalità della proteina CFTR, viene utilizzato in casi difficili di diagnosi della patologia.

Test genetico: ricerca di mutazioni specifiche nel gene CFTR attraverso diverse tecniche molecolari. Si può utilizzare la tecnica NGS (*new generation sequencing*) per sequenziare il gene CFTR o fare l'esoma del gene stesso, questo consiste nel sequenziamento di solo gli esoni del gene; se con queste tecniche non vengono individuate mutazioni si può ricorrere a MLPA per identificare delezioni specifiche in esoni o RT-PCR per le varianti di splicing che alterano il messaggero.

Diagnosi prenatale: indaga lo stato di salute del feto durante la gravidanza attraverso test genetici, i più comuni sono villocentesi e amniocentesi. La villocentesi viene attuata attraverso lo svolgimento di due test consecutivi: entro la prima settimana si prelevano cellule del citotrofoblasto dei villi coriali, in seguito entro la terza settimana si analizzano le cellule mesenchimali dei villi coriali. Se entrambi gli esami risultano positivi si procede con la conferma della diagnosi di Fibrosi Cistica attraverso amniocentesi, la quale consiste nell'analisi del liquido amniotico.

Screening neonatale: test della tripsina immunoreattiva attraverso un prelievo di sangue del neonato. Viene svolto il terzo giorno di vita e, se risulta positivo, viene ripetuto dopo un mese; solo se anche la seconda analisi risulta positiva si passa al test del sudore o a quello genetico.

1.3 Le classi mutazionali responsabili di Fibrosi Cistica

Classe I: completa assenza di proteina CFTR, i pazienti affetti da questa mutazione non hanno nessun canale.

Classe II: anomala localizzazione del canale, sono mutazioni che consentono la sintesi della proteina ma ne causano il blocco del trasporto o l'alterazione dello stesso.

Classe III: alterazione nel meccanismo di regolazione del canale.

Classe IV: alterazione della frequenza del flusso di ioni cloro a causa della riduzione del tempo di apertura del canale.

Classe V: riduzione della quantità di canali CFTR attivi; questo può avvenire a causa della sintesi ridotta di proteine o a causa della presenza di molte proteine anomale che vengono degradate, riducendo allo stesso modo il numero di CFTR funzionanti presenti nell'organismo.

Classe VI: turnover più elevato di proteine CFTR, vengono sintetizzate ma si degradano molto rapidamente.

Alcune mutazioni possono appartenere contemporaneamente a più classi manifestando diverse modalità di malfunzionamento della proteina CFTR, questo rende il trattamento della patologia ancora più complesso.

Le mutazioni di classe I, II e III sono tipicamente associate ad insufficienza pancreatica, con conseguenza un'insufficiente produzione di enzimi digestivi necessari per assorbire e digerire i grassi. Le mutazioni di classe IV, V e VI al contrario permettono una produzione, anche se limitata, di enzimi pancreatici.

1.4 I geni modificatori

La gravità della patologia nei singoli pazienti affetti da Fibrosi Cistica non dipende solo dalla tipologia di mutazioni presenti nel gene CFTR, ma anche da altri fattori genetici definiti come geni modificatori. Questi hanno la funzione di modificare l'espressione di altri geni o di modularne l'effetto attraverso un'azione diretta (agiscono direttamente sul gene target) o indiretta.

Nel caso di pazienti affetti da Fibrosi Cistica mutazioni in questi geni possono aggravare o attenuare gli effetti causati dalle mutazioni presenti nel gene CFTR; possono ad esempio alterare la maturazione o il funzionamento della proteina. Questo spiega perché individui con lo stesso genotipo, ovvero con la stessa mutazione nel gene CFTR, possono avere fenotipi e gravità della malattia molto differenti tra loro. Ad oggi i geni modificatori per CFTR individuati sono circa 30, tra questi i primi ad essere analizzati sono TGFB1 (*Transforming Growth Factor Beta 1*) che funge da modulatore della malattia respiratoria, PPARy (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma*) che funge da modulatore del rischio di diabete, SERPINA1 (*Serpin Family A Member 1*) che funge da modulatore epatico e MBL2 (*Mannose Binding Lectin*) implicato nella risposta del sistema immunitario contro patogeni.

1.4 Il concetto di portatore

La patologia si manifesta solo quando il paziente eredita dai genitori due copie mutate del gene CFTR, quindi nei pazienti omozigoti per l'allele mutato; coloro i quali possiedono solo una copia mutata, detti eterozigoti, sono portatori sani=non hanno la Fibrosi Cistica né evidenziano alcun sintomo. Per verificare se si è portatori si può ricorrere ad uno specifico esame del sangue per effettuare un test genetico. Ci sono anche in questo caso diversi tipi di test per identificare le mutazioni nel gene CFTR: i test più semplici definiti di primo livello identificano le mutazioni più frequenti, i test più complessi (secondo o terzo livello) identificano anche quelle più rare; in media vengono individuati circa 8-9 portatori sani su 10.

Il test per portatori sani di Fibrosi Cistica è fortemente consigliato quando la coppia sa di avere un genitore malato, sa di avere un parente portatore o uno dei due partner è o portatore sano o malato di Fibrosi Cistica.

1.5 Fisiopatologia

Ghiandole esocrine: possono essere ostruite da muco denso presente nel lume, produrre eccessive quantità di secrezioni o secernere eccessive quantità di cloro e sodio.

Apparato respiratorio: l'ostruzione dovuta al muco, l'infezione batterica cronica e la risposta immunitaria pronunciata danneggiano facilmente le vie aeree portando ad insufficienza respiratoria e bronchiectasie. Nelle prime fasi di malattia il patogeno più diffuso che colonizza le vie aeree è Staphilococcus Aureus, nelle fasi successive possono insorgere infezioni dovute a Pseudomonas Aeruginosa.

Apparato gastrointestinale: sono spesso affetti l'intestino, il pancreas e il sistema epatobiliare; nell'85-95% dei pazienti la funzione esogena del pancreas è compromessa e la gravità della condizione tende ad aumentare con l'età. Le conseguenze sono malassorbimento di grassi, di vitamine liposolubili e proteine; tripsina e chimotripsina sono assenti o ridotte nelle feci, si ha alterata tolleranza al glucosio o diabete mellito nel 50% degli adulti. Nel 3% dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica si verificano anche patologie a carico del fegato; la cirrosi epatica è la causa di morte non respiratoria più comune.

Apparato urinario: le complicanze renali aumentano con l'età, è molto comune l'insorgenza di calcolosi renale e di nefropatia con livelli elevati di IgA dovuti a infezioni ricorrenti e infiammazioni croniche che possono originare glomerulonefrite acuta.

Apparato scheletrico: sono comuni osteopenia e osteoporosi, possono insorgere patologie ossee dovute a deficit di calcio, deficit di vitamine e ipogonadismo.

Apparato riproduttivo: il 98% dei soggetti adulti di sesso maschile sono non fertili a causa dell'alterato sviluppo dei dotti deferenti o azoospermia ostruttiva. Nelle donne la maggior parte riesce a portare a termine delle gravidanze; in circa il 30-70% delle donne si verifica inoltre incontinenza da stress.

Capitolo 2

Alcune terapie standard

Antimicrobici: hanno la funzione di limitare le infezioni da parte di patogeni in pazienti affetti da Fibrosi Cistica. Ceftaroline è una cefalosporina di quinta generazione attiva sia contro batteri gram positivi che contro gram negativi, agisce anche contro ceppi di stafilococchi meticillina resistenti (MRSA).

Terapie inalatorie: Bronchitol è una terapia a base di mannitolo in polvere efficace e tollerata nel lungo periodo, molto semplice da utilizzare nel quotidiano e con rapida velocità di somministrazione rispetto alla terapia aerosolica. La terapia inalatoria consente una migliore nebulizzazione del farmaco per raggiungere le vie aeree più profonde.

Fisioterapia e riabilitazione respiratoria: servono per rimuovere il muco dalle vie respiratorie, vengono utilizzate diverse tecniche di rimozione o drenaggio delle secrezioni. Può essere necessario l'impiego di incentivatori della fase respiratoria per esercitare i muscoli inspiratori, fondamentale è invece l'educazione precoce al movimento che aiuta a rendere l'attività respiratoria più efficiente e ad eliminare le secrezioni.

Nutrizione: consiste spesso in un'alimentazione ipercalorica, ricca di grassi, a cui viene associata la somministrazione di enzimi pancreatici in sostituzione a quelli non prodotti dal pancreas. Si ha integrazione di vitamine liposolubili e, soprattutto nel bambino, supplementazione con sale. In adolescenti e adulti si possono avere casi di diabete che vengono controllati attraverso iniezioni quotidiane di insulina.

Capitolo 3

Terapie innovative: i modulatori CFTR

I modulatori CFTR sono delle piccole molecole che si legano al canale e si differenziano dalle precedenti terapie per la Fibrosi Cistica poiché il loro scopo è quello di aumentare, o potenzialmente ristabilire, la funzione della proteina CFTR avente una specifica variante. Essi sono infatti "accoppiati" a CFTR con diverse varianti e hanno un meccanismo d'azione molto specifico. Possono portare a miglioramenti molto importanti nel paziente per quanto riguarda la funzione polmonare, stabilità funzionale dei polmoni, eliminazione di muco, peso e crescita, PH intestinale e riconoscimento di patogeni.

Presentano inoltre dei vantaggi rispetto ad altre terapie nucleotidiche aventi lo scopo di riparare o sostituire il gene CFTR, ad esempio le loro piccole dimensioni permettono un facile assorbimento, un dosaggio per via orale e una disponibilità sistemica della molecola per trattare difetti in più compartimenti dell'organismo.

Esistono essenzialmente tre modalità per aumentare o migliorare l'attività della proteina CFTR: aumentare il numero di canali disponibili sulla membrana plasmatica, aumentare il tempo in cui i canali rimangono aperti o aumentare la dimensione dei canali. L'attività dei modulatori si basa proprio su questi 3 principi e gli stessi possono essere combinati tra loro per correggere mutazioni causative di molteplici difetti.

I modulatori sono divisi in 5 classi a seconda dei loro effetti sulla proteina CFTR:

Potenziatori: aumentano l'apertura del canale in modo che esso si trovi più a lungo nella configurazione aperta, ne consegue un aumento del trasporto di ioni attraverso l'epitelio. Uno dei primi ad essere stato realizzato è ivacaftor, medicinale efficace solo in pazienti che presentano mutazioni di classe III (alterazione nel meccanismo di regolazione del canale).

Correttori: Uno di questi è VX-809, prodotto per i pazienti che hanno la specifica mutazione F508del per migliorare il trasporto del canale e la sua localizzazione sulla membrana plasmatica. Altri agiscono come chaperon farmaceutici per evitare che la proteina CFTR con la mutazione F508del venga distrutta mediante il processo di

degradazione associata al reticolo endoplasmatico (ERAD); questo viene attuato attraverso la stabilizzazione del ripiegamento della proteina.

Stabilizzatori: hanno la funzione di legarsi a CFTR per stabilizzare la proteina sulla membrana plasmatica, ridurne il turnover e aumentarne la longevità.

Amplificatori: stabilizzano l'mRNA CFTR attraverso un meccanismo che necessita solo del trascritto e di un processo di allungamento; gli amplificatori arricchiscono il messaggero e aumentano la sua efficienza di traduzione attraverso l'incremento della porzione di mRNA associato ai polisomi. Uno di questi è nesolicaftor.

Agenti di lettura: hanno la funzione di correggere le mutazioni nonsenso situate nel trascritto CFTR permettendo la produzione di una proteina completa e funzionante; ad esempio, ELX-02 fa sì che non avvenga l'inserimento di un codone di stop prematuro grazie all'interazione della molecola con il ribosoma.

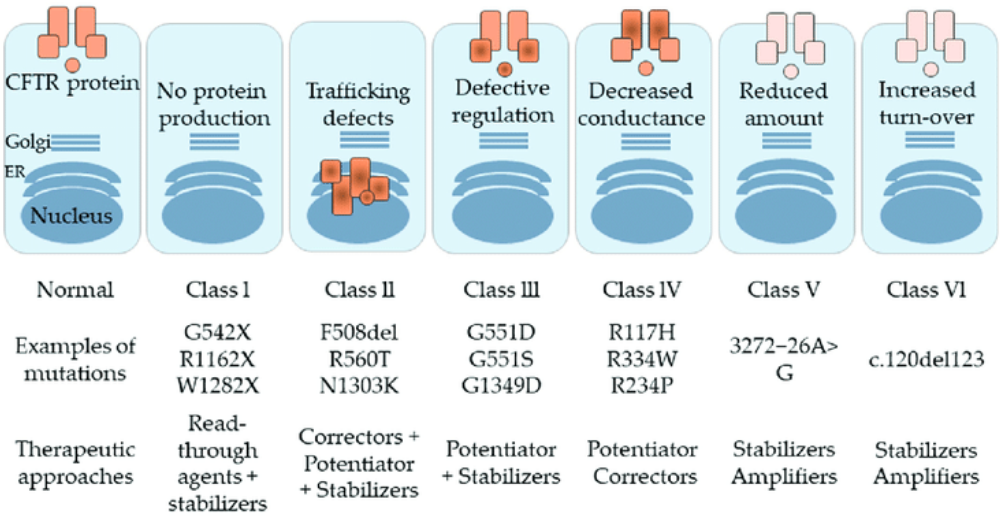

Immagine 3.1: classi mutazionali del gene CFTR e i modulatori ad esse associate.

3.1 Il metabolismo dei modulatori CFTR

Il metabolismo dei modulatori avviene a livello del fegato e nella maggior parte dei casi il farmaco deve subire delle modifiche per poter essere eliminato; per interagire con le cellule dell'organismo deve essere lipofilo, ovvero sciogliersi facilmente nei grassi, per

essere eliminato deve invece diventare idrosolubile. Nel fegato si trova il sistema enzimatico adibito alla trasformazione del farmaco: citocromo 450 o CYP, che comprende una grande famiglia di enzimi, tra questi quello più coinvolto con il metabolismo dei modulatori è CYP3A4. Quando un farmaco viene introdotto nell'organismo può avere due effetti principali sull'attività enzimatica di CYP:

- Induzione: aumento dell'attività enzimatica; il farmaco viene molto metabolizzato, si riduce la sua quantità presente nel sangue e il suo effetto sull'organismo.
- Inibizione: diminuzione dell'attività enzimatica; il farmaco viene meno metabolizzato, rimane in circolo anche a livelli elevati e sarà più facilmente responsabile di effetti collaterali.

La concentrazione nel sangue di modulatori CFTR può aumentare in seguito all'assunzione contemporanea di alcuni composti, tra questi i farmaci antifungini e gli antibiotici macrolidi poiché inibitori di CYP3A.

Allo stesso modo la concentrazione nel sangue dei modulatori CFTR può diminuire in seguito all'assunzione contemporanea di altri composti, tra questi i farmaci antiepilettici e alcuni antibiotici come rifamicina e rifambutina; entrambe le tipologie di composti sono forti induttori di CYP3A.

Anche i modulatori a loro volta possono aumentare o diminuire la concentrazione di alcuni farmaci nel sangue, è per questo fondamentale discutere con il medico dell'uso di altri medicinali o sostanze in concomitanza con i modulatori CFTR.

3.2 Effetti collaterali comuni da somministrazione di modulatori

Uno dei problemi più frequenti causati dalla somministrazione di modulatori CFTR è l'aumento degli indici di citolisi epatica, in particolare degli enzimi alanina-amino-transferasi, aspartato-amino-transferasi e bilirubina prodotta dal fegato. Questo si manifesta circa nel 50-60% dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica e va monitorato nel tempo. Si consiglia di interrompere la terapia se i livelli dei tre enzimi epatici sono 5 volte

sopra il limite massimo, è inoltre raccomandata la riduzione della stessa quando è già presente una patologia epatica moderata.

Altri effetti collaterali comuni dovuti alla somministrazione di modulatori sono cefalee, infezioni delle vie aeree superiori, disturbi gastrointestinali, artralgia e vertigini.

Alcune ricerche sembrano dimostrare possibili effetti collaterali al sistema nervoso centrale con insorgenza di ansia, depressione, emicranie e istinti suicidi; questo è stato però individuato in un numero molto ridotto di pazienti e non sono ancora stati condotti degli studi che possano affermare con certezza l'azione nociva dei modulatori CFTR sul sistema nervoso.

3.3 Vanzacaftor

È un correttore CFTR somministrato per via orale che aumenta il processamento, il trasporto della proteina e il trasporto di ioni cloruro se combinato con tezacaftor e deutivacaftor. Permette di migliorare la funzione polmonare, i sintomi respiratori e in generale la funzione della proteina CFTR. In vitro vanzacaftor stimola la produzione di K+ a concentrazioni micro-molari nelle cellule epiteliali dei bronchi e aumenta significativamente la densità di corrente dei canali BKCa. In alcuni studi effettuati in vitro sembra che il modulatore diminuisca la frequenza dei potenziali d'azione e alteri l'eccitabilità dei neuroni primari dell'ippocampo, ma non è ancora stata accertata l'accuratezza dei metodi con cui è stato effettuato questo studio.

3.4 Tezacaftor

È un correttore CFTR che agisce facilitando il ripiegamento e la presentazione della proteina sulla superficie cellulare, questo migliora il funzionamento del canale nei pazienti con la mutazione F508del. Viene somministrato per via orale ed è indicato per pazienti con doppia mutazione F508del o una di queste mutazioni associata a mutazioni definite "a funzione residua", le quali consentono una parziale funzionalità della proteina CFTR. I più comuni effetti collaterali associati alla somministrazione di tezacaftor sono

tosse, nausea, affaticamento e aumento di muco. A differenza del correttore lumacaftor, tezacaftor non induce la produzione dell'enzima CYP3A e non mostra nessuna interazione con ivacaftor durante il suo metabolismo.

3.5 Ivacaftor

È un potenziatore CFTR che, se usato singolarmente, viene indicato per il trattamento di Fibrosi Cistica in pazienti di un mese o di età superiore; usato in combinata con lumacaftor è indicato per pazienti omozigoti per la mutazione F508del. In combinata con tezacaftor è invece usato in pazienti di 12 anni o di età superiore che hanno almeno una mutazione nel gene CFTR. La molecola agisce aumentando la probabilità di apertura del canale attraverso dei meccanismi che impediscono lo scorretto ripiegamento della proteina, con conseguenza l'aumento del processamento e del trasporto della proteina matura sulla superficie cellulare. La mono-terapia con ivacaftor non ha mostrato benefici nei pazienti affetti dalla mutazione F508del, al contrario è stata approvata per pazienti con la mutazione missenso G551D. Viene somministrato per via orale, ha un buon assorbimento a livello del tratto gastrointestinale e fa parte della classe dei chinoloni.

3.6 Deutivacaftor

È un deuterato di ivacaftor (d9-ivacaftor), ovvero la stessa molecola a cui sono stati sostituiti 9 atomi di idrogeno con l'isotopo deuterio. Non sono state evidenziate particolari modifiche nel metabolismo del farmaco in seguito al processo di deuterazione, si è invece dimostrato che deutivacaftor può essere somministrato una sola volta al giorno al contrario di ivacaftor che necessita di due somministrazioni al giorno. Questa modifica ha inoltre permesso di ottenere un miglioramento nei parametri di PK, un emi-vita maggiore della molecola e un'eliminazione da parte dell'organismo molto più lenta.

Capitolo 4

Il processo di deuterazione

L'idrogeno, il più abbondante elemento nell'universo, ha 3 isotopi naturali: il prozio che ha un protone e un elettrone, il deuterio con un elettrone e due neutroni e il trizio con un elettrone e tre neutroni. Poiché il deuterio e il trizio possono essere facilmente individuati attraverso misurazione di radioattività e spettrometria di massa sono molto usati in diagnostica per comprendere diversi processi biologici. Al contrario del trizio che è un isotopo radioattivo il deuterio è stabile e può essere maneggiato senza particolari precauzioni, per questo motivo lo sta sostituendo in molti ambiti biomedici.

La popolarità di questo isotopo nella produzione farmaceutica è aumentata esponenzialmente non solo per la sua sicurezza se usato come marker in studi metabolici, ma anche grazie al fatto che può essere incorporato in prodotti farmaceutici attivi come un bioisoestere. I due isotopi prozio e deuterio sono molto simili in termini di proprietà fisico-chimiche, l'unica differenza sostanziale è che il deuterio ha una massa due volte superiore al prozio. Ne consegue che il legame carbonio-deuterio ha una minore energia allo stato fondamentale, una maggiore energia di attivazione e quindi è più stabile rispetto al legame carbonio-prozio.

Il processo di deuterazione consiste nella sostituzione di un atomo di prozio con il suo isotopo più pesante deuterio; questa modifica strutturale può migliorare la farmacocinetica e il profilo di tossicità dei farmaci, portando alla realizzazione di molecole più sicure ed efficaci rispetto ai composti non deuterati. Il processo ha la caratteristica di impattare positivamente il destino metabolico di composti farmaceutici senza alterare la loro struttura chimica, le loro proprietà fisiche, la loro attività biologica o la loro selettività. La sostituzione di H con D è una strategia utilizzata dalle case farmaceutiche per attenuare il metabolismo mediato da CYP e gli svantaggi ad esso correlati.

È infatti stimato che più della metà dei farmaci sul mercato siano metabolizzati da enzimi della famiglia del citocromo P450; questo metabolismo di tipo ossidativo può

avere dei grossi svantaggi come formazione di composti instabili, reattivi, non selettivi e tossici, ricorrenza della variabilità da paziente a paziente a causa della presenza di polimorfismi. Si può avere infine saturazione, induzione o inibizione dell'enzima, con conseguenza la formazione di farmaci potenzialmente pericolosi.

L'effetto primario dei composti deuterati è il miglioramento della performance di PK, che può risultare nella necessità di una dose minore e minore frequenza di somministrazione in pazienti. Bisogna però essere molto cauti perché il processo di deuterazione può portare all'alterazione di alcune vie di biotrasformazione e aumentare il metabolismo del farmaco in siti alternativi, processo definito come switching metabolico; questo termine comprende anche il caso in cui venga aumentata l'attivazione di una via metabolica alternativa o indesiderata.

Il primo composto deuterato ad essere introdotto nel mercato e approvato dall'FDA nel 2017 è stato deutetrabenazina, nel 2022 è stato invece approvato il primo composto deuterato de novo deucravacitinib.

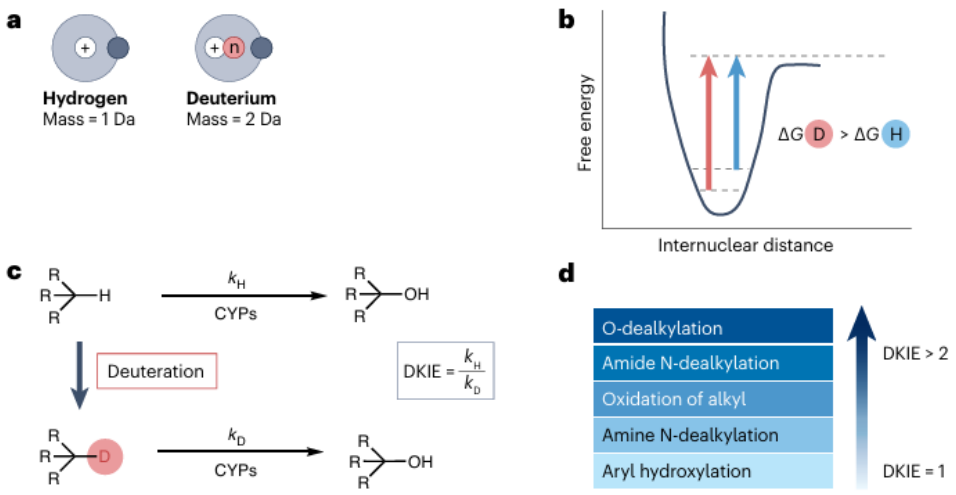

Immagine 4.1: differenze tra prozio e deuterio in termini di distanza internucleare e DKIE (*deuterium kinetic isotope effect*).

Capitolo 5

Il farmaco Alyftrek (vanzacaftor, tezacaftor, deutivacaftor)

È indicato per il trattamento di pazienti affetti da Fibrosi Cistica con età di 6 anni o superiore che hanno almeno una mutazione F508del o un'altra mutazione nel gene CFTR. Fa parte della classe dei modulatori CFTR di nuova generazione e a tripla combinazione: è infatti una combinazione dei 3 modulatori vanzacaftor, tezacaftor e deutivacaftor che hanno l'obbiettivo di aumentare la funzionalità della proteina mutata. È stato pensato come il successore di Trikafta, un altro modulatore a tripla combinazione composto da elexacaftor, ivacaftor, tezacaftor; è stato approvato dall'FDA (*Food and Drug Administration*) nel dicembre 2024.

Dosaggio: prima di somministrare Alyftrek è necessario effettuare dei test sulla funzionalità epatica al paziente a cui viene prescritto, è inoltre fondamentale effettuare gli stessi test ogni mese durante i primi 6 mesi di trattamento; successivamente possono essere svolti ogni 3 mesi per i successivi 12 mesi e una volta l'anno in seguito. I monitoraggi dovranno essere più frequenti se il paziente possiede una patologia del fegato o presenta esiti del test di funzione epatica con valori molto elevati. Il dosaggio consigliato in adulti e ragazzi con età superiore a 12 anni è di 2 pastiglie di vanzacaftor 10 mg, 2 di tezacaftor 50 mg e 2 di deutivacaftor 125 mg giornaliere; per i bambini dai 6 ai 12 anni che pesano meno di 40 Kg il dosaggio è di 3 pastiglie di vanzacaftor 4 mg, 3 di tezacaftor 20 mg, 3 di deutivacaftor 50 mg giornaliere. Le pastiglie vengono somministrate per via orale con cibi contenenti grasso possibilmente sempre alla stessa ora del giorno tutti i giorni; se ci si dimentica di prendere una pastiglia la si può assumere entro 6 ore dalla dose mancata, se invece sono passate più di 6 ore si continua con le dosi successive della giornata senza assumere quella persa.

Effetti collaterali: elevata transaminasi, possibile danno al fegato grave o potenzialmente fatale causato dalla somministrazione del farmaco; sono per questo necessari i test che verificano la funzionalità epatica. Si può sviluppare ipersensibilità, anafilassi, cataratta in pazienti pediatrici che presentano fattori di rischio per l'insorgenza

della stessa. Altri effetti collaterali sono affaticamento, mal di testa, naso faringite, tosse, congestione nasale, pressione sanguigna alta e aumento di creatina fosfochinasi.

Interazione con altri farmaci o sostanze: è sconsigliato l'uso di Alyftrek con induttori di CYP3A poiché tutti e 3 i modulatori (vanzacaftor, tezacaftor, deutivacaftor) sono dei substrati dello stesso CYP3A; l'uso in concomitanza di Alyftrek e induttori porta quindi ad una diminuzione dell'efficienza del farmaco. È allo stesso modo sconsigliato l'uso di Alyftrek con inibitori di CYP3A perché aumentano l'esposizione del farmaco e quindi il rischio di reazione avverse. È infine opportuno evitare di consumare succo d'uva perché esso contiene uno o più componenti che fungono da inibitori di CYP3A.

Tezacaftor e deutivacaftor sono inibitori P-gp, per questo la somministrazione contemporanea con P-gp può aumentare il rischio di reazioni avverse correlate a questo tipo di substrati. I due modulatori sono anche inibitori di BCRP in vitro, l'uso di tezacaftor e deutivacaftor con BCRP potrebbe aumentare l'esposizione dei substrati stessi.

Meccanismo d'azione del farmaco: vanzacaftor e tezacaftor si legano a diversi siti della proteina CFTR e hanno la funzione di facilitarne il processamento cellulare e il trasporto, con lo scopo di aumentare la quantità di CFTR inviata verso la superficie cellulare; deutivacaftor ha invece la funzione di aumentare la probabilità di apertura del canale. L'effetto combinato dei tre modulatori porta alla produzione di una maggiore quantità di proteine CFTR che hanno inoltre maggiore efficienza.

Trasporto di cloro in cellule della tiroide di topo esprimenti mutanti CFTR: attuando degli studi su cellule FRT è stato verificato che Alyftrek aumenta il trasporto di cloro in quelle cellule della tiroide che presentano specifiche mutazioni nel gene CFTR. Lo stesso risultato è stato evidenziato in cellule umane dell'epitelio bronchiale.

Table 6: Pharmacokinetics Parameters of ALYFTREK Components			
	Vanzacaftor	**Tezacaftor**	**Deutivacaftor**
Exposure			
$C_{max,ss}$ (mcg/mL)	0.812 (0.344)	6.77 (1.24)	2.33 (0.637)
$AUC_{0\text{-}24h,ss}$ (mcg·h/mL)	18.6 (8.08)	89.5 (28.0)	39.0 (15.3)
Time to steady state	within 20 days	within 8 days	within 8 days
AUC Accumulation Ratio	6.09 (1.81)	1.92 (0.337)	1.74 (0.497)
Absorption			
T_{max}* (hours)	7.80 (3.70, 11.9)	1.60 (1.40, 1.70)	3.7 (2.7, 11.4)
Effect of food			
AUC_{inf}†	Increase 4- (low-fat meal) to 6- (high-fat meal) fold	No clinically significant change	Increase 3- (low-fat meal) to 4- (high-fat meal) fold
Distribution‡			

Apparent (oral) volume of distribution (L)	121 (28.6)	73.1 (13.3)	159 (26.1)
Protein Binding[§]	> 99%	Approximately 99%	> 99%
Elimination			
Effective Half-life (hours)[¶]	92.8 (30.2)	22.5 (5.85)	19.2 (8.71)
Apparent (oral) Clearance (L/hours)	1.34 (0.819)	1.22 (0.390)	7.29 (2.68)
Metabolism			
Primary Pathway	CYP3A4/5	CYP3A4/5	CYP3A4/5
Active metabolites	None	M1-TEZ	M1-D-IVA
Metabolite potency (relative to parent)	Not applicable	Similar	Approximately 20%
Excretion[#]			
Feces	91.6% (primarily metabolites)	72% (unchanged or M2-TEZ) [0.79% as unchanged drug]	Not available
Urine	0.50%	13.7%	Not available

Immagine 5.1: i parametri farmacocinetici del farmaco Alyftrek.

Rispetto al precedente farmaco Kaftrio il nuovo farmaco, grazie al potenziatore deutivacaftor, mostra vantaggi sull'emivita consentendo un'unica somministrazione giornaliera al posto di due. Inoltre, Alyftrek è stato approvato per trattare circa 31 mutazioni in più rispetto a Trikafta, un ulteriore predecessore utilizzato per trattare pazienti affetti da Fibrosi Cistica.

Il farmaco è disponibile in due dosaggi:

- pastiglie rotonde con V4 scritto da un lato, le quali contengono 4 mg vanzacaftor, 20 mg tezacaftor, 50 mg deutivacaftor
- pastiglie di forma allungata con V10 scritto da un lato, le quali contengono 10 mg vanzacaftor, 50 mg tezacaftor, 125 mg deutivacaftor

Capitolo 6

Trial clinici

Con il termine trial clinico si intende qualsiasi studio sull'uomo finalizzato a comprendere gli effetti di un farmaco con l'obbiettivo di accertarne la sicurezza e l'efficienza per l'uomo stesso. La sperimentazione clinica consiste di più fasi:

Fase 1: sperimentazione del principio attivo sull'uomo, viene attuata in pochi centri specializzati e in pazienti sani. L'obbiettivo principale è valutare i possibili effetti collaterali del farmaco, solo se questo risulta avere una tossicità accettabile si passa alle fasi successive.

Fase 2: indagine sull'attività terapeutica potenziale del farmaco e sulla dose migliore da somministrare al paziente. In questi studi la sostanza è somministrata a soggetti volontari affetti dalla patologia per cui il farmaco è stato progettato.

Fase 3: determinazione dell'efficacia del farmaco e confronto con altri farmaci già in commercio; studio del rapporto rischio-beneficio. I pazienti arruolati in questa fase sono centinaia o addirittura migliaia e si attua uno studio di tipo clinico controllato randomizzato: ai pazienti viene somministrato in maniera casuale il principio attivo.

Fase 4: comprende gli studi che vengono effettuati dopo l'approvazione del farmaco, è detta fase della sorveglianza di marketing. In questa fase si acquisiscono nuove informazioni e si studiano anche le reazioni avverse più rare.

Trial SKYLINE 102-103: studio sull'efficienza del farmaco Alyftrek e confronto con Trikafta.

L'approvazione da parte dell'FDA del farmaco Alyftrek si basa principalmente su dati raccolti dagli studi SKYLINE 103 e SKYLINE 102; questi sono trial clinici di fase 3 in cui sono stati analizzati circa 1.000 pazienti affetti da Fibrosi Cistica con età di 12 anni o superiore e con almeno una copia della mutazione F508del o di un'altra mutazione

rappresentativa. A tutti i partecipanti è stato somministrato il farmaco Trikafta, successivamente ad alcuni pazienti scelti in maniera casuale è stato sostituito il farmaco precedente con Alyftrek per circa 6 mesi. L'obbiettivo principale di questi studi era verificare se Alyftrek fosse almeno efficiente come Trikafta a mantenere i livelli di ppFEV1 (volume di forza espiratoria percentuale predetta in 1 secondo) e comparare gli effetti dei due farmaci sui livelli di sudore. Per quanto riguarda il primo obbiettivo è stato verificato che, in seguito alla somministrazione dei 2 farmaci, i risultati ottenuti erano molto simili; mentre, per quanto riguarda il livello di sudore, è stato provato che Alyftrek è più efficiente rispetto a Trikafta a ridurre la sudorazione con una differenza di 8.4 millimole per litro in un trial e 2.8 millimole per litro nel secondo trial. Gli effetti collaterali dovuti alla somministrazione dei farmaci sono moderati, tra questi i più comuni l'esacerbazione polmonare infettiva, la tosse e la naso faringite.

Trial RIDGELINE VX21-121-105: verifica della sicurezza e tollerabilità del farmaco Alyftrek in pazienti pediatrici.

Trial clinico di fase 3, i pazienti affetti da Fibrosi Cistica sono stati selezionati da 33 centri che si occupano di bambini affetti dalla patologia in 8 paesi differenti: Germania, Stati Uniti, Regno Unito, Francia, Australia, Svezia, Norvegia e Svizzera. I partecipanti hanno età compresa tra i 6 e gli 11 anni e sono portatori di almeno una mutazione nel gene CFTR responsiva al trattamento con Alyftrek. Ad essi viene somministrato per 24 settimane il farmaco con l'obbiettivo di stabilire la sua sicurezza e tollerabilità attraverso la misurazione di reazioni avverse, segni vitali e valori clinici di laboratorio. In seguito a questo studio è stato osservato che le reazioni avverse nei bambini erano molto lievi o moderate, tra cui le più comuni la tosse, l'esacerbazione polmonare infettiva e il dolore orofaringeo. Solo l'8% dei partecipanti ha sviluppato reazioni avverse gravi tra cui costipazione, infezione da parte di adenovirus, esacerbazione polmonare infettiva grave e test della funzione polmonare con valori ridotti. Questo ha efficacemente dimostrato che il farmaco risulta sicuro e tollerato anche in bambini oltre che offrire dei grandi

benefici come la diminuzione nella produzione di sudore e il generale miglioramento funzionale della proteina CFTR.

Trial VX18-561-101: verifica della sicurezza ed efficacia del farmaco Alyftrek in adulti.

Due trial di fase 2 per verificare la sicurezza di una singola dose giornaliera della combinazione dei tre modulatori vanzacaftor, tezacaftor e deutivacaftor in pazienti affetti da Fibrosi Cistica con età di 18 anni o superiore. Il primo trial ha il fine di confrontare la monoterapia con ivacaftor e quella con deutivacaftor in pazienti con mutazioni di classe III nel gene CFTR attraverso la somministrazione dei 2 farmaci per 4 settimane. Il secondo trial viene invece condotto in pazienti con la mutazione F508del in eterozigosi e una mutazione a funzione residua o in pazienti omozigoti per la mutazione F508del. I maggiori effetti collaterali registrati sono tosse, emicranie e aumento di muco; ne consegue che una singola dose giornaliera del farmaco Alyftrek può essere considerata sicura e ben tollerata oltre che migliorare la funzione polmonare, i sintomi respiratori dei pazienti e la funzione della proteina CFTR.

Capitolo 7

Utilizzo di cellule iPSC per il test di modulatori CFTR

Le cellule umane staminali pluripotenti indotte (iPSC) sono delle cellule somatiche adulte che sono state riprogrammate geneticamente per ritornare allo stato staminale di pluripotenza, ovvero lo stato in cui sono ancora indifferenziate e in cui possono dividersi originando diverse tipologie di cellule dell'organismo. Sono state scoperte nel 2006 dal ricercatore giapponese Shinya Yamanaka che ha identificato una serie di fattori di trascrizione, detti Yamanaka factors, i quali sono in grado di ripristinare la pluripotenza di cellule adulte; tra questi fattori ricordiamo Oct4, Soc2, Klf4 e c-Myc. Essendo cellule staminali pluripotenti esse non sono in grado di originare un organismo completo, non possono infatti generare i tessuti extraembrionali come la placenta, ma possono differenziarsi in quasi tutti i tipi cellulari.

Tutto ciò rende le cellule iPSC molto utili nell'ambito della ricerca e del test di farmaci in quanto permettono di originare, attraverso la somministrazione di fattori di crescita specifici, una linea cellulare definita che è poi in grado di crescere in vitro. Nel caso di individui affetti da Fibrosi Cistica le cellule iPSC contengono il codice genetico completo del donatore, inclusa la sequenza del gene CFTR con la mutazione specifica di quel paziente donatore. Per questo possono essere differenziate in cellule di diversi tessuti, ad esempio in cellule dell'epitelio delle vie aeree, per studiare l'effetto della terapia con modulatori sul fenotipo tipico di pazienti affetti da Fibrosi Cistica.

Il primo step è quindi creare una "banca" di cellule iPSC: nello studio preso in considerazione sono state assemblate delle linee di cellule staminali pluripotenti indotte provenienti da individui con mutazioni di classe I, II e III nel gene CFTR. Tra le linee di cellule iPSC con varianti di classe II due di queste hanno la variante F508del in omozigosi, la terza presenta la variante F508del e Ile507del in eterozigosi; per le varianti di classe I sono state prelevate due linee di cellule somatiche poi riprogrammate a iPSC con varianti nonsenso nell'esone 23 in omozigosi, per quelle di classe III sono stati selezionati due dei pochi individui aventi la variante Gly551Asp in omozigosi. Tutte le

cellule staminali derivanti dai donatori affetti sono state poi differenziate in cellule epiteliali delle vie aeree, le quali risultano più piccole e più dense rispetto a quelle di pazienti sani, e a queste sono stati infine somministrati dei modulatori CFTR.

Analisi elettro-fisiologica di cellule iPSC trattate con modulatori: si attua attraverso la misurazione del trasporto di ioni attraverso l'epitelio delle vie aeree. In seguito al trattamento con modulatori si osserva che, dopo 8-14 giorni, lo strato epiteliale mantiene la sua funzione di barriera e la sua resistenza elettrica trans epiteliale; si osserva inoltre la presenza di ciglia mobili e muco. Confrontando i livelli di marker respiratori di cellule mutate trattate con modulatori e linee cellulari prelevate da pazienti sani si evidenzia che i valori sono molto simili fra loro, questo a dimostrazione dell'efficienza della terapia; confrontando diversi modulatori CFTR si è potuto infine constatare che quelli di nuova generazione sembrano aumentare maggiormente la corrente ionica rispetto a quelli precedentemente scoperti.

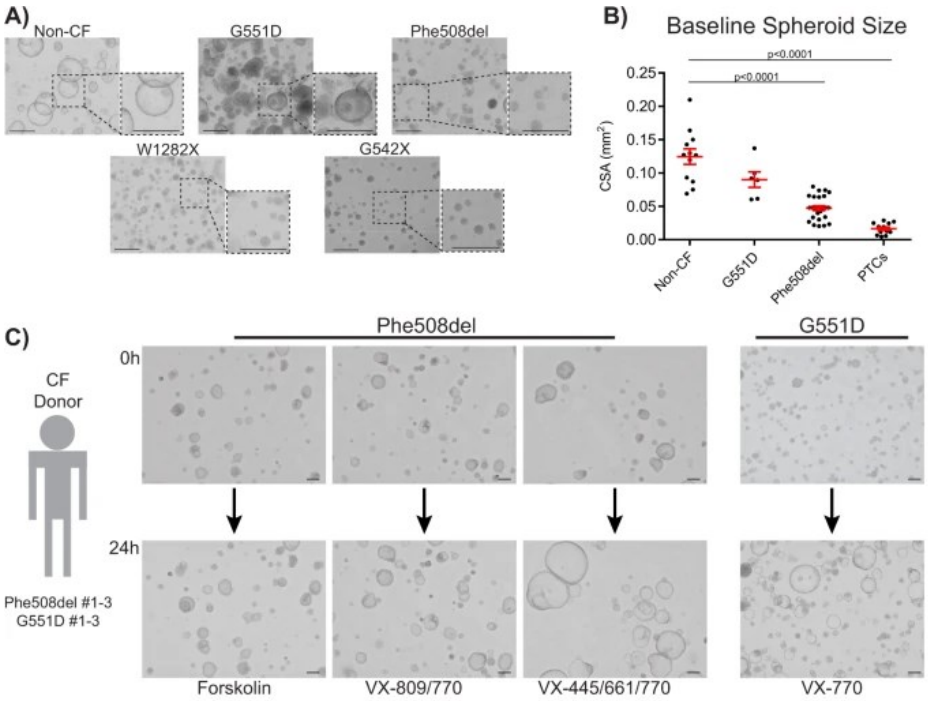

Immagine 7.1: caratterizzazione degli sferoidi dell'epitelio delle vie aeree derivanti dalle cellule iPSC in termini di dimensioni, morfologia e CSA.

Conclusione

La terapia basata sui modulatori CFTR è stata molto sviluppata dalla descrizione del primo modulatore risalente a circa 15 anni fa, grazie a studi avanzati della proteina CFTR e del suo funzionamento è stato inoltre possibile allargare lo spettro di candidati adatti a questo tipo di terapia del 50%. L'ulteriore sviluppo di queste molecole nei prossimi anni sarà fondamentale per i pazienti affetti dalla patologia, l'obbiettivo è assicurare che esse siano il più possibile coerenti con la variante specifica presente nel singolo individuo e riuscire a soddisfare i bisogni anche dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica nelle forme più acute.

Per questo sarà necessario attuare diversi trial clinici che stabiliscano l'efficacia e la sicurezza di questi nuovi modulatori, ma la sfida più grande sarà sicuramente rendere la terapia più accessibile alla popolazione. Ad oggi il costo per la produzione di queste molecole è infatti estremamente elevato (per terapia con il farmaco ivacaftor sono richiesti 171.600 € all'anno circa a paziente negli USA), il che costituisce una barriera per molti pazienti presenti in diversi paesi del mondo.

Bibliografia

FDA (Food and Drug Administration) Novel Drug Therapy Approvals for 2024, *Alyftreck label*

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2024/218730s000lbl.pdf

Marcella Nunziato in "Biochimica Clinica", *La Fibrosi Cistica: comorbidità, geni modificatori e medicina di precisione.*

https://biochimicaclinica.it/wp-content/uploads/2023/03/1712-2021.023_Nunziato.pdf

MedChemExpress, *Vanzacaftor (VX-121) | CFTR Modulator*.

https://medchemexpress.com/vanzacaftor.html

Nature Communications, *A multimodal iPSC platform for cystic fibrosis drug testing.*

https://www.nature.com/articles/s41467-022-31854-8

Nature Reviews Drug Discovery, *Deuterium in drug discovery*: *progress, opportunities and challenges.*

https://www.nature.com/articles/s41573-023-00703-8

Paola Fossa in "Chimica e Farmaceutica", *Studi strutturistici sulla proteina CFTR: opportunità e prospettive.*

https://www.soc.chim.it/sites/default/files/chimind/pdf/2019_1_48_ca.pdf

PubChem, *Ivacaftor | C24H28N2O3 | CID 16220172*.

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ivacaftor

PubChem, *Tezacaftor | C26H27F3N2O6 | CID 46199646*.

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tezacaftor

PubMed, *Vanzacaftor-tezacaftor-deutivacaftor versus elexacaftor-tezacaftor-ivacaftor in individuals with cystic fibrosis aged 12 years and older (SKYLINE Trials VX20-121-102 and VX20-121-103): results from two randomised, active-controlled, phase 3 trials.*

https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39756424/

PubMed, *Vanzacaftor, tezacaftor, deutivacaftor for children aged 6-11 years with cystic fibrosis (RIDGELINE Trial VX21-121-105): an analysis from a single-arm, phase 3 trial.*

https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39756425/