

Dominika Nesteruk, Katarzyna Wertheim-Tysarowska, Jerzy Bal

# NOWE MOŻLIWOŚCI TERAPII W MUKOWISCYDOZIE

## CYSTIC FIBROSIS EMERGING THERAPIES

Zakład Genetyki Medycznej  
Instytut Matki i Dziecka

### Streszczenie

Mukowiscydoza (CF) jest jedną z najczęstszych chorób monogenowych w populacji kaukaskiej, dziedziczonych autosomalnie recesywnie. Przyczyną mukowiscydozy jest występowanie patogennych mutacji w obu allelach genu CFTR, kodującego białko przezbłonowego regulatora transportu jonów. CF jest chorobą wielonarządową o zróżnicowanym przebiegu klinicznym. Wysoka śmiertelność chorych z mukowiscydozą jest spowodowana przede wszystkim postępującymi i nieodwracalnymi zmianami w płucach, prowadzącymi do niewydolności układu oddechowego. W związku z tym, przewlekła choroba płucna stanowi podstawowy cel w poszukiwaniu skutecznych rozwiązań terapeutycznych. W ostatnich latach nastąpił duży postęp w zakresie badań nad wczesnym rozpoznaniem choroby i jej leczeniem. Najnowsze strategie skupiają się nie tylko na chorobie płucnej (stany zapalne wywołane infekcjami bakteryjnymi oraz obturacja wskutek zagęszczenia wydzieliny dróg oddechowych), ale i na przyczynie choroby, czyli naprawie wadliwego genu CFTR i jego białkowego produktu. Na amerykańskim i europejskim rynku medycznym pojawiły się już pierwsze leki kierowane do pacjentów z określonym genotypem: VX-770 modulujący funkcję wadliwego białka CFTR oraz PTC124 działający na poziomie nieprawidłowego mRNA genu CFTR. Jednocześnie prowadzonych jest wiele badań w zakresie somatycznej terapii genowej w poszukiwaniu skutecznych rozwiązań dostarczenia prawidłowego genu CFTR do komórek układu oddechowego oraz utrzymania jego ekspresji w komórkach docelowych. W niniejszej pracy omówiono postęp jaki uzyskano w rozwoju terapii będącej zarówno na etapie badań przedklinicznych, jak i klinicznych.

**Słowa kluczowe:** mukowiscydoza, CFTR, terapia genowa, wzmacniacz, korektor, supresor

### Abstract

Cystic fibrosis is one of the most common recessively inherited monogenic disorders in the Caucasian population. The disease develops when pathogenic mutations of the CFTR gene, encoding a transmembrane conductance regulator, are present in both alleles. Cystic fibrosis is a multi-organ disease with heterozygous clinical course. High mortality of the disease is mainly due to progressive and irreversible changes in the lungs, leading to respiratory failure. Therefore, chronic obstructive pulmonary disease is the primary target in the search for effective therapeutic solutions. In recent years there has been a significant progress in the research on early diagnosis and treatment of cystic fibrosis. The newest strategies focus not only on the main symptoms of pulmonary disease (inflammation caused by bacterial infection and obstruction due to thickened mucus), but also on the correction of the cystic fibrosis cause – defective CFTR gene and its protein product. Therapeutics like VX-770 and PTC124, intended for patients with a specific genotype, have already emerged on the U.S. and European medical market. They modulate the defective CFTR protein function or act on the level of abnormal CFTR mRNA, respectively. At the same time scientists develop new solutions in the field of somatic gene therapy in order to increase the efficiency of corrected CFTR delivery to the respiratory tract cells and to maintain its expression in the target cells. In this review we discuss the progress achieved in the development of therapy that is at the stage of both preclinical and clinical phases.

**Key words:** cystic fibrosis, CFTR, gene therapy, potentiator, corrector, suppressor

Mukowiscydoza (CF, ang. *cystic fibrosis*) jest chorobą dziedziczną w sposób autosomalny recesywny. Oszacowana dla populacji kaukaskiej częstość występowania tej choroby wynosi 1 na 2500 żywych urodzeń (1), a nosicielstwo mutacji patogenicznej 1 na 25 osób. Jednak dane uzyskane z przesiewów noworodkowych w kierunku mukowiscydozy, prowadzonych w krajach europejskich oraz rejestrów Europejskiego Towarzystwa Mukowiscydozy wskazują na niższą częstość występowania choroby (2).

## PODŁOŻE MOLEKULARNE MUKOWISCYDOZY

Mukowiscydoza warunkowana jest występowaniem patogennych mutacji w obu allelach genu *CFTR* (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), kodującego białko przezbłonowego regulatora transportu jonów (*CFTR*). *CFTR* pełni funkcję kanału jonowego zlokalizowanego głównie w komórkach nabłonkowych gruczołów potowych, trzustki, przewodu pokarmowego, oddechowego i nasieniowodów. *CFTR* jest odpowiedzialny za objętość i strukturę wydzielin w wymienionych powyżej organach i układach (3).

Białko *CFTR* składa się z dwóch domen przezbłonowych MSD (ang. *membrane spanning domain*), tworzących selektywny por, dwóch domen NBD (ang. *nucleotide binding domain*), wiążących ATP oraz domeny regulatorowej (R). Działanie kanału jest regulowane przez hydrolizę cząsteczek ATP oraz fosforylację domeny R. Kanał *CFTR* odgrywa kluczową rolę w transporcie jonów  $\text{Cl}^-$  oraz reguluje działanie innych kanałów błonowych m.in. kanału sodowego ENaC (ang. *epithelial sodium channel*) czy chlorkowego kanału ORCC (ang. *outwardly rectifying chloride channel*). Kanał *CFTR* bierze również udział w transporcie dwuwęglanów ( $\text{HCO}_3^-$ ), które

regulują lokalny poziom pH oraz rozluźniają zwartą strukturę mucyn (4). Dysfunkcja kanału *CFTR* prowadzi do ograniczenia transportu jonów  $\text{Cl}^-$  do światła przewodu i jednocześnie zbyt wzmożonego transportu jonów  $\text{Na}^+$  do komórek nabłonkowych. Spadek stężenia jonów w warstwie wydzieliny powoduje jej odwodnienie i zagęszczenie. W drogach oddechowych pacjentów z CF gęsta wydzielina o wysokiej lepkości i spoistości stanowi środowisko sprzyjające rozwojowi bakterii, szczególnie *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*, co sprzyja wystąpieniu stanu zapalnego (5).

Do tej pory zidentyfikowano ponad 1900 mutacji w genie *CFTR* (<http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>). Tradycyjnie mutacje patogenne podzielone są na sześć klas, zgodnie z efektem jaki wywierają na budowę i funkcję białka (tab. I). Dana mutacja może być zaklasyfikowana do więcej niż jednej klasy, co jest szczególnie istotne przy wyborze terapii kombinowanej. Przykładem takiej zmiany jest delecja fenyloalaniny w pozycji 508, F508del, należąca do klasy II, będąca najczęstszą mutacją w genie *CFTR* (około 56% alleli w populacji polskiej (8)), która poza negatywnym wpływem na dojrzewanie białka, obniża również przewodnictwo jonowe (4).

Między ilością natywnego białka *CFTR* a klinicznym fenotypem choroby istnieje pewna korelacja. W zależności od tkanki/organu próg tolerancji na obniżony poziom ekspresji *CFTR* jest różny np. przy 10% poziomie białka nie obserwuje się wystąpienia objawów chorobowych ze strony płuc (9), natomiast stwierdza się zmiany w nasieniowodach (10).

## CELE TERAPEUTYCZNE

Mukowiscydoza jest chorobą wielonarządową o heterogennym przebiegu klinicznym i z tego względu chory wymaga leczenia wielospecjalistycznego. Za wysoką

Tabela I. Klasyfikacja mutacji patogennych w mukowiscydozie. Wg Kreindler, 2010 (7); Mazurczak, 2006 (8).

Table I. Pathogenic mutations classification in cystic fibrosis. Based on Kreindler, 2010 (7); Mazurczak, 2006 (8).

Klasa Class	Przykładowe mutacje Mutations	Klasyfikacja Classification	Efekt mutacji na poziomie białkowym Consequences on protein
I	R553X, G542X	Powstanie przedwczesnego kodonu stop <i>Premature termination codon introduction</i>	Niefunkcjonalne, skrócone białko <i>Nonfunctional, truncated protein</i>
II	F508del, N1303K	Zaburzenie dojrzewania białka <i>Protein maturation defect</i>	Skierowanie białka na drogę degradacji <i>Protein degradation</i>
III	G551D	Brak aktywności białka <i>Lack of protein activity</i>	Defekt otwierania/zamykania kanału <i>Gating defect</i>
IV	R117H	Ograniczona zdolność przewodzenia <i>Conductance disruption</i>	Zmniejszony przepływ jonów $\text{Cl}^-$ <i>Decreased <math>\text{Cl}^-</math> ion conductance</i>
V	3849+10kbC>T	Zaburzenie składania transkryptu mRNA <i>mRNA splicing defect</i>	Zmniejszona ilość białka prawidłowego <i>Reduced amount of native protein</i>
VI	Q1412X	Zaburzenie oddziaływań <i>CFTR</i> z innymi kanałami w błonie <i>Disruption of <i>CFTR</i> interaction with other membrane channels</i>	Zaburzona stabilność kanału i obniżone przewodnictwo jonów innych niż $\text{Cl}^-$ <i>Membrane stability disruption and reduced conductance of ions other than <math>\text{Cl}^-</math></i>

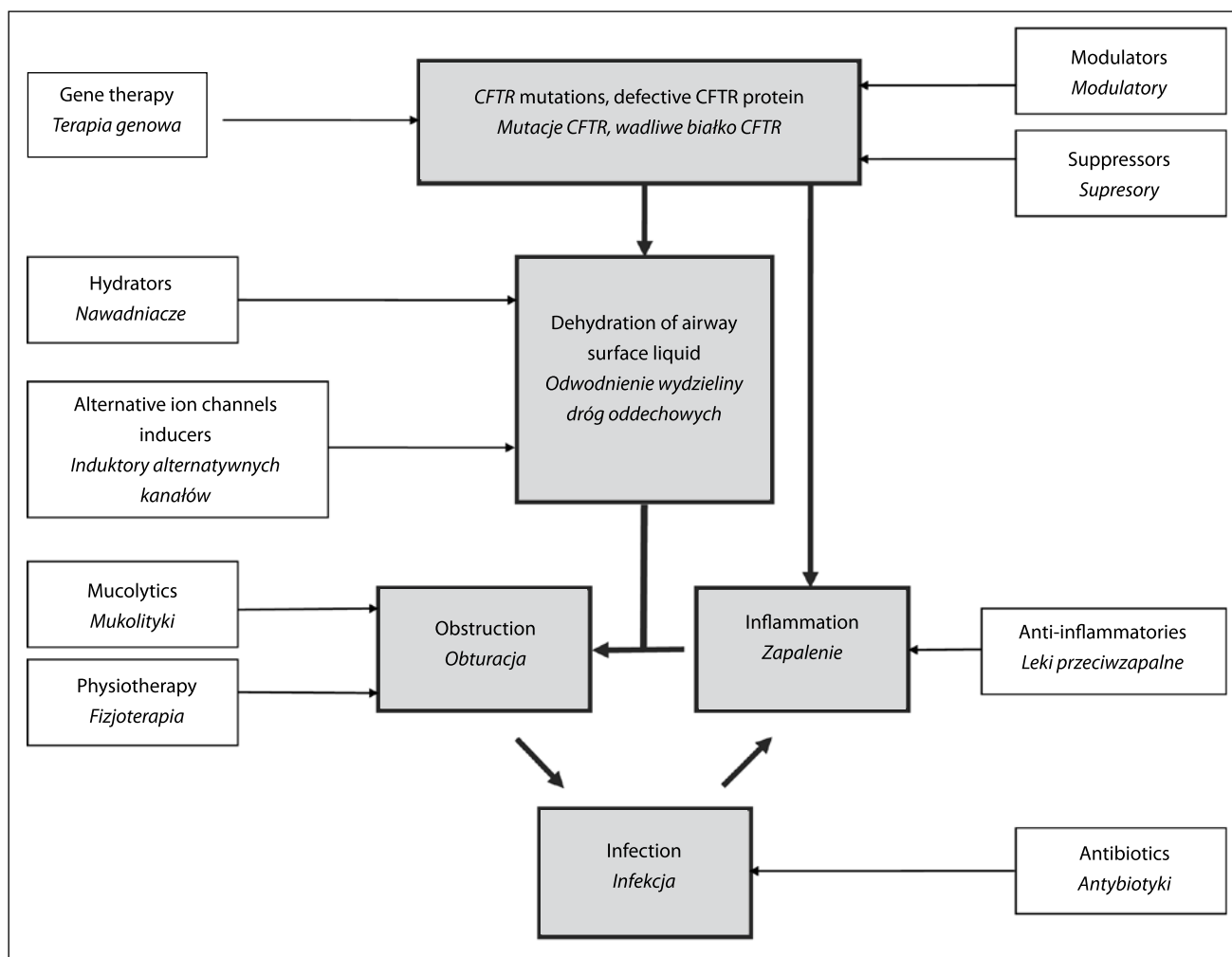
śmiertelność pacjentów cierpiących na mukowiscydozę odpowiedzialna jest przewlekła i nawracająca choroba płuc, która stanowi podstawowy problem terapeutyczny. Dzięki pogłębianiu wiedzy z zakresu patologii molekularnej choroby oraz wprowadzeniu ogólnopolskiego Programu Badań Przesiewowych Noworodków w kierunku mukowiscydozy, jej wykrywalność skróciła się do pierwszych tygodni życia, umożliwiając wczesną diagnozę, a tym samym rozpoczęcie leczenia zanim pojawią się pierwsze objawy ze strony układu oddechowego (11).

Dysfunkcja kanału CFTR skutkuje szeregiem zmian patologicznych w drogach oddechowych, w tym w płucach (odwodnienie wydzieliny, stan zapalny, infekcje bakteryjne, obturacja) (12). Dlatego też konieczne jest stosowanie wielokierunkowej strategii terapeutycznej (ryc. 1, tab. II). Aby złagodzić stan zapalny i zapobiec rozwinięciu się infekcji bakteryjnej stosowane są środki przeciwzapalne oraz antybiotyki. W celu rozrzedzenia wydzieliny i umożliwienia jej swobodnego przesuwania się w drogach oddechowych

stosowane są substancje nawadniające takie, jak hipertoniczny roztwór soli oraz mukolityki np. rekombinowana ludzka DNaza I. Podstawowym elementem towarzyszącym temu leczeniu jest regularnie prowadzona fizjoterapia klatki piersiowej, w celu eliminacji zagęszczonej wydzieliny z organizmu pacjenta. Aby przywrócić właściwą strukturę wydzieliny, poszukuje się również induktorów transportu jonów  $Cl^-$  przez alternatywnie działające kanały w błonie komórkowej (tab. II).

## MODULATORY BIAŁKA CFTR

W ostatnich latach nastąpił duży postęp w leczeniu chorych na mukowiscydozę ukierunkowanym na „naprawę” nieprawidłowego białka CFTR. Terapia ta kierowana jest do pacjentów z określonym genotypem CF. Związki modulujące strukturę białka lub jego aktywność można podzielić na dwie grupy: wzmacniacze oraz korektory (6).



Ryc. 1. Patologia choroby płucnej w przebiegu mukowiscydozy i strategii terapeutyczne. W szarych prostokątach przedstawione zostały cele terapeutyczne, a w białych ukierunkowane na nie terapie. Zmodyfikowany, przedruk zgodnie z warunkami licencji Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) z Flume PA, Van Devanter DR. State of progress in treating cystic fibrosis respiratory disease. BMC Med. 2012 Aug 10;10:88 (3).

Fig. 1. Clinical manifestation of lung disease in cystic fibrosis and therapeutic strategies directed at them. White boxes present strategies directed at therapeutic aims presented in grey boxes. Modified, reprinted under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) from Flume PA, Van Devanter DR. State of progress in treating cystic fibrosis respiratory disease. BMC Med. 2012 Aug 10;10:88 (3).

Tabela II. Najnowsze strategie w terapii mukowiscydozy.  
 Table II. Emerging therapeutic strategies in cystic fibrosis.

Cel terapeutyczny <i>Therapeutic aim</i>	Lek <i>Medicine</i>	Mechanizm działania <i>Mechanism of action</i>	Faza badań <i>Trial phase</i>	Uwagi <i>Comments</i>	Piśmiennictwo <i>Reference</i>
<b>Zapalenie</b> <i>Inflammation</i>	KB001A (fragment rekombinowanego przeciwciała monoklonalnego) <i>KB001A (recombinant monoclonal antibody fragment)</i>	Blokada kompleksu białek bakterii <i>P.aeruginosa</i> , odpowiedzialnego za nekrozę komórek układu immunologicznego pacjentów z CF <i>Inhibition of P.aeruginosa protein complex responsible for immune cells necrosis of CF patients</i>	II		François i wsp., 2012 (13)
	alfa-1-antytrypsyna <i>alpha-1-antitrypsin</i>	Inaktywacja elastazy wydzielanej przez neutrofile <i>Neutrophilic elastase inhibition</i>	II		Griese i wsp., 2007, (14)
	Sildenafil (Viagra, inhibitor fosfodiesterazy typu 5) <i>Sildenafil (Viagra, type 5 phosphodiesterase inhibitor)</i>	Aktywacja procesu dojrzewania białka z mutacją F508del, ograniczenie napływu neutrofilii do płuc <i>Induction of F508del protein maturation; limitation of neutrophils migration to lungs</i>	II		Lubamba i wsp., 2012, (6)
	PUR118 (sole wapnia w postaci suchego proszku) <i>PUR118 (dry powder calcium salts)</i>	Obniżenie aktywności makrofagów <i>Macrophages activity reduction</i>	I	Stosowane u pacjentów z łagodną przewlekłą obturacyjną chorobą płuc, dalsze etapy badań wstrzymane <i>Trials conducted among patients with chronic obstructive pulmonary disease; further stages of trials discontinued</i>	Arold i wsp., 2012 (15), Wright i wsp., 2012 (16)
<b>Zakażenie bakteryjne</b> <i>Bacterial infection</i>	Arikace (amikacyna w liposomach) <i>Aricace (liposomal amikacin)</i>	Obniżenie kolonizacji <i>P.aeruginosa</i> , wydłużony czas uwalniania antybiotyku z liposomów <i>Reduction of P.aeruginosa colonisation, extended time of liposomal antibiotic release</i>	III		Clancy i wsp., 2013 (17)
	L-arginina <i>L-arginine</i>	Zwiększony poziom wydychanego NO <i>Increased amount of exhaled NO</i>	II	L-arginina jest wewnątrzkomórkowym źródłem NO <i>L-arginine is an intracellular source of NO</i>	Grasemann i wsp., 2013 (18)

Tabela II. Cd.  
Table II. Cont.

<p><b>Nieprawidłowa struktura wydzieliny dróg oddechowych</b> <i>Airway surface liquid defect</i></p>	<p>Bronchitol (mannitol w postaci suchego proszku) <i>Bronchitol (dry powder mannitol)</i></p>	<p>Zwiększenie przepływu wody do przestrzeni pozakomórkowej i upłynnienie wydzieliny w drogach oddechowych <i>Increased water reabsorption to extracellular space and rehydration of airway surface liquid</i></p>	<p>III</p>	<p>Lek wycofany z dalszych badań z powodu braku korzystnych efektów <i>Trial discontinued due to the lack of beneficial effects</i></p>	<p>Aitken i wsp., 2012 (19)</p>
<p>Denufosol tetrasodowy <i>Tetrasodium denufosol</i></p>	<p>Aktywacja receptorów P2Y2 i stymulacja wydzielenia Cl<sup>-</sup> przez kanał CaCC oraz zahamowanie przepływu Na<sup>+</sup> do wnętrza komórek <i>Activation of P2Y2 receptors, stimulation of Cl<sup>-</sup> secretion by CaCC channel and inhibition of Na<sup>+</sup> conductance into the cell</i></p>	<p>III</p>	<p>Zemanick i wsp., 2010 (20)</p>	<p>III</p>	<p>Zwiększenie przepływu wody do przestrzeni pozakomórkowej i upłynnienie wydzieliny w drogach oddechowych <i>Increased water reabsorption to extracellular space and rehydration of airway surface liquid</i></p>

## Wzmacniacze

Do tej grupy zaliczane są związki przywracające funkcję kanału (6), działające w docelowym miejscu białka czyli w błonie komórkowej. Przykładem takiego związku jest lek VX-770 (Kalydeco<sup>TM</sup>, Ivacaftor), zatwierdzony w 2012 roku przez FDA<sup>1</sup> (3) i EMA<sup>2</sup> oraz w 2013 roku przez TGA<sup>3</sup> w Australii. VX-770 jest kierowany do pacjentów powyżej 6 roku życia, u których na genotyp CF składa się przynajmniej jedna mutacja G551D (21). Substytucja glicyny (G) w pozycji 551 łańcucha białkowego CFTR w kwas asparaginowy (D) występuje u 4-5% pacjentów z CF (22), w tym z częstością 0,5% w populacji polskiej (11, dane Zakładu Genetyki Medycznej IMiD).

Dokładny mechanizm działania VX-770 nie jest znany. Dysfunkcja domeny NBD1, w której znajduje się aminokwas 551, powoduje ograniczoną możliwość wiązania cząsteczek ATP, a tym samym przewodzenia jonów przez kanał CFTR. VX-770 prawdopodobnie powoduje „ominięcie” lub wręcz przeciwnie, wzmocnienie etapu wiązania cząsteczki ATP przez kieszenie domen NBD, umożliwiając prawidłowe funkcjonowanie kanału (23).

U pacjentów powyżej 12 roku życia, po zastosowaniu terapii VX-770, nastąpiła poprawa funkcji płuc, spadek stężenia Cl<sup>-</sup> w pocie, zwiększenie masy ciała oraz poprawa jakości życia. Nie zaobserwowano specyficznych efektów niepożądanych związanych ze stosowaniem VX-770 (22). III faza badań leku potwierdziła długofalową skuteczność jego działania oraz bezpieczeństwo stosowania (24). Podobne wyniki uzyskano u pacjentów w wieku 6-11 lat (21).

Badania przedkliniczne potwierdziły wydłużenie czasu otwarcia kanału do wartości równych 30%-118% prawidłowego CFTR oraz 10-krotne zwiększenie transportu jonów Cl<sup>-</sup> w komórkach z innymi mutacjami klasy III (G178R, S549N, S549R, G551S, G970R, G1244E, S1251N, S1255P, G1349D). Zmiany te lokalizują się w domenach NBD lub wewnątrzkomórkowych pętłach, biorących udział w przekazywaniu zmian konformacyjnych białka po związaniu ATP (23). W 2013 roku ogłoszono pierwsze wyniki badań nad skutecznością działania VX-770 u pacjentów powyżej 6. roku życia z co najmniej jedną mutacją z klasy III, nie będącą G551D. Terapia przyniosła podobne efekty, jak u pacjentów z mutacją G551D. W lutym 2014 roku FDA zatwierdziło stosowanie VX-770 również u pacjentów powyżej 6. roku życia posiadających co najmniej jedną z ośmiu kolejnych mutacji klasy III: G178R, S549N, S549R, G551S, G1244E, S1251N, S1255P, G1349 D. Aktualnie prowadzone są badania u dzieci z CF w wieku 2-5 lat posiadających w genotypie co najmniej jedną mutację z klasy III, w tym G155D (Informacje ze strony internetowej producenta: <http://investors.vrtx.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=781005>).

Równocześnie oceniana jest skuteczność wykorzystania wzmacniaczy u pacjentów z mutacjami należącymi do klas innych niż III. Rozpoczęta została trzecia faza badań klinicznych VX-770 kierowana do pacjentów z mutacją R117H w co najmniej jednym allelu genu CFTR (Informacje ze strony internetowej producenta: <http://investors.vrtx.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=781005>).

<sup>1</sup>Food and Drug Administration

<sup>2</sup>European Medicines Agency

<sup>3</sup>Therapeutic Goods Administration

Warto również wspomnieć, że terapia VX-770 nie przyniosła korzyści u pacjentów z mutacją F508del w układzie homozygotycznym, co jest prawdopodobnie związane ze zbyt małą ilością wadliwego białka docierającego do błony komórkowej (21).

### Korektory

Korektory działają na etapie dojrzewania białka CFTR. Nieprawidłowo sfałdowane białko, posiadające mutację z klasy II, jest kierowane na drogę degradacji. W obecności korektora wadliwe białko ulega prawidłowemu fałdowaniu i trafia do błony komórkowej. Dotychczas została opracowana grupa korektorów dla mutacji F508del, zlokalizowanej w domenie NBD1 (25).

Delecja fenyloalaniny w pozycji 508 powoduje odsłonięcie hydrofobowej części białka (26), stanowiącej sygnał dla wewnątrzkomórkowych regulatorów dojrzewania do jego degradacji oraz przyczynia się do zaburzenia oddziaływania domeny NBD1 z wewnątrzkomórkową pętlą domeny MSD. Szacuje się, że 20-25% białka F508del musi zostać odzyskane z siateczki śródplazmatycznej (ER), aby terapia z zastosowaniem korektora przyniosła pacjentom korzyść (27).

Do tej pory w badaniach klinicznych oceniono działanie korektorów VX-809 (Lumacaftor), VX-661 oraz VX-983, których grupą docelową są pacjenci z genotypem p. [F508del];[F508del] (zgodnie z nomenklaturą HGVS). Ponieważ w I fazie badań nad VX-809 nie osiągnięto oczekiwanej poprawy w wartościach przelnobłonkowej różnicy potencjałów w przewodach nosowych (NPD) i w odsetku zaostrzeń choroby płuc, do kolejnych etapów badań wprowadzono terapię kombinowaną ze wzmacniaczem VX-770 (28). Aktualnie trwa III faza badań. Planowane są również badania u pacjentów w wieku 6-11 lat oraz u pacjentów z genotypem p. [F508del];[m], gdzie m jest inną mutacją niż F508del (Informacje ze strony internetowej producenta: <http://investors.vrtx.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=743425>).

Badania *in vitro* wykazały, że VX-809 zwiększa stabilność konformacyjną białka F508del znajdującego się w ER. Przy zablokowaniu eksportu białek z ER do aparatu Golgiego, około 28% uwięzionego, wadliwego białka było odporne na degradację w obecności VX-809 (29).

Kolejny lek z grupy korektorów to VX-661. Aktualnie trwa II faza badań, oceniająca bezpieczeństwo i skuteczność stosowania monoterapii VX-661 oraz terapii kombinowanej VX-661 z VX-770 (28). Pierwsze wyniki badania wykazały spadek poziomu jonów Cl<sup>-</sup> w pocie w obydwu grupach badanych (VX-661 oraz VX-661+VX-770) oraz zależną od dawki poprawę wskaźnika czynności płuc w grupie z terapią kombinowaną (Informacje ze strony internetowej producenta: <http://investors.vrtx.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=757597>).

VX-983 jest trzecim korektorem, który ma wejść w fazę badań klinicznych u pacjentów z CF. Aktualnie oceniana jest tolerancja różnych dawek VX-983 wśród zdrowych wolontariuszy. Jest zaplanowane rozpoczęcie badania z terapią kombinowaną VX-983 z VX-770 (Informacje ze strony internetowej producenta: <http://investors.vrtx.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=757597>).

### SUPRESORY W TERAPII MUKOWISCYDOZY

Mutacje powodujące wprowadzenie przedwczesnych kodonów stop – PTC (ang. *premature termination codons*) stanowią 5-10% wszystkich mutacji wśród pacjentów z mukowiscydozą, przy czym w niektórych populacjach np. Żydów aszkenazyjskich odsetek ten sięga nawet 60% (30). Konsekwencją PTC jest nie tylko zatrzymanie translacji i powstanie skróconego, niefunkcjonalnego białka, ale także indukcja degradacji mRNA (ang. *nonsense-mediated mRNA decay*), co powoduje obniżenie ilości matrycy do syntezy białek (31).

Supresory wykazują zdolność selektywnej supresji (pominięcia) PTC, co pozwala na uzyskanie pełnej długości funkcjonalnego białka (32).

Antybiotyki aminoglikozydowe takie, jak gentamycyna, tobramycyna czy amikacyna zaburzają proces translacji u bakterii, czego następstwem jest powstawanie niefunkcjonalnych białek i śmierć komórki bakteryjnej. Dowiedzono, że aminoglikozydy przy wyższych stężeniach wykazują zdolność supresji PTC u ludzi. Działanie to jest warunkowane przez strukturę samego antybiotyku, typ kodonu stop oraz sekwencję nukleotydów go otaczających. Antybiotyki te poprzez kumulację w komórkach kanalików proksymalnych kory nerek oraz w komórkach rzęskowych narządu Cortiego, wykazują działanie toksyczne i powodują nieodwracalne zmiany w nerkach i w narządzie słuchu (32). Nefro- i ototoksyczność przy wysokich stężeniach antybiotyków, niezbędnych do otrzymania satysfakcjonujących efektów terapeutycznych, wyklucza zatem ich stosowanie w długofalowym leczeniu chorób genetycznych. W związku z tym poszukuje się syntetycznych związków alternatywnych (31).

Przykładem takiej substancji jest PTC124 (Ataluren), który ma nadany przez FDA i EMA status „leku sierociego” w leczeniu mukowiscydozy oraz dystrofii mięśniowej Duchenne’a i Beckera, wywołanych mutacjami typu nonsense. PTC124 nie wykazuje właściwości antybakteryjnych i działa w sposób odmienny niż aminoglikozydy. III faza badań klinicznych u pacjentów z co najmniej jedną mutacją typu nonsense w genotypie, wykazała poprawę parametru NPD oraz poprawę funkcji płuc. Różnice te, w porównaniu do grupy placebo, były jednak istotne statystycznie tylko w grupie pacjentów nie będących przed rozpoczęciem badań na długotrwałej terapii antybiotykami inhalacyjnymi (21, informacje ze strony internetowej producenta: <http://ptct.client.shareholder.com/ReleaseDetail.cfm?releaseid=681445>).

Inną strategią terapeutyczną jest wytwarzanie syntetycznych aminoglikozydów o wyższej wydajności supresji PTC przy jednocześnie niższej toksyczności. Przykładem jest NB54, którego zdolność do supresji PTC została potwierdzona w badaniach przedklinicznych (33).

Przy rozwoju terapii z wykorzystaniem supresorów PTC istnieją obawy związane z hamowaniem prawidłowych kodonów STOP, będących sygnałem do zakończenia translacji natywnych białek. Badania przedkliniczne wskazują na zróżnicowane mechanizmy zakończenia translacji poprzez PTC i prawidłowe kodony STOP oraz na większą podatność PTC na supresję. Nie obserwowano niespecyficznego wydłużania (elongacji)

mRNA genów kontrolnych (32). Jednak ze względu na potencjalnie istniejące ryzyko supresji prawidłowych kodonów STOP genów kodujących kluczowe dla cyklu komórkowego białka, pacjenci na długofalowych terapiach PTC124 powinni być ściśle monitorowani pod kątem onkologicznym (21).

## PRÓBY TERAPII GENOWEJ W MUKOWISCYDOZIE

Terapia genowa polega na naprawie defektu w materiale genetycznym w komórce lub w organizmie mającej na celu leczenie chorego bądź uzyskanie poprawy jego stanu zdrowia (9). Taka procedura terapeutyczna, przeprowadzona w komórkach somatycznych nie wyeliminuje przyczyny choroby, natomiast może przywrócić prawidłową funkcję danego białka w części komórek/tkanek. Terapia genowa w komórkach germinalnych lub na wczesnych etapach rozwoju zarodkowego pozwoliłaby na eliminację przyczyny choroby monogenowej, jednak ten możliwy typ terapii natrafia na szereg sprzecznych motywów względami etycznymi.

Sukces somatycznej terapii genowej jest m.in. uzależniony od czasu utrzymania się „naprawionego” genu w komórkach docelowych oraz od poziomu ekspresji „naprawionego” białka (34). Większość prób terapii genowej u osób z chorobą monogenową, w tym mukowiscydozą, opiera się na strategii komplementacji defektu genetycznego (ang. *gene addition*), której celem jest dostarczenie do komórki docelowej fragmentu cDNA, komplementarnego do dojrzałej, natywnej cząsteczki mRNA, pod kontrolą transkrypcyjną promotora. Gen „terapeutyczny” jest dostarczany do docelowej komórki za pomocą nośników wirusowych bądź niewirusowych. Wektor taki musi być odpowiednio zoptymalizowany aby zapewnić swoisty transfer oraz wydajną ekspresję transgeny, a czas ekspresji kodowanego przezeń białka będzie zależał od długości życia komórek docelowych (34).

Wektory niewirusowe zawierają cDNA docelowego genu/fragmentu genu oraz cząsteczkę nośnika, która ma zdolność wiązania się z ujemnie naładowaną cząsteczką cDNA. Nośniki można podzielić na lipidy i polimery kationowe, które otaczają lub zagęszczają DNA, tworząc odpowiednio lipopleksy lub polipleksy (35). Wydajność transferu genu z wykorzystaniem tych nośników jest zdecydowanie niższa w porównaniu z wektorami wirusowymi. Jest to związane z brakiem specyficznych białek, które wspomagałyby wejście wektora do komórki, ucieczkę z endosomów i transport wewnątrzkomórkowy do jądra komórkowego. Jednocześnie, brak tych białek może wpływać na lepszą tolerancję wektorów niewirusowych przez organizm ludzki (35).

Cząsteczką najlepiej zbadaną, która po optymalizacji weszła w fazę badań klinicznych w Wielkiej Brytanii jest GL67A. Jest to pochodna cholesterolu, zawierająca cząsteczkę DOPA (3,4-dihydroksyfenyloalanina) ułatwiającą transport endosomalny plazmidu oraz cząsteczki DMPE+PEG (dimirystoilo-glicerofosfoetanoloamina + glikol polietylenowy), które zapobiegają agregacji i precipitacji cząsteczek w wysokich stężeniach plazmidu (36).

W celu zmniejszenia immunogenności oraz zwiększenia wydajności ekspresji transgeny, plazmid pGM169 z wbudowanym cDNA *CFTR* został odpowiednio zmodyfikowany poprzez wprowadzenie promotora hybrydowego z elementami regulatorowymi cytomegalowirusa oraz wyeliminowanie sekwencji aktywujących odpowiedź zapalną. Aktualnie trwa II faza badań klinicznych, oceniająca poprawę funkcji płuc przy stosowaniu powtarzalnych dawek GLA67A z plazmidem pGM169 (9).

Wektory wirusowe mogą z kolei integrować się z genomem komórki docelowej lub pozostawać w formie episomalnej na terenie komórki. Integracja z genomem niesie ze sobą ryzyko mutagenyzy insercyjnej poprzez niekontrolowane miejsce wbudowania DNA wirusa. Z kolei wektory wirusowe, których materiał genetyczny pozostaje w formie kolistej na terenie komórki charakteryzują się przejściową ekspresją transgeny na niskim poziomie. Niska wydajność transferu genu, krótki czas jego ekspresji oraz ograniczona pojemność stanowią główne trudności związane ze stosowaniem tego typów wektorów (34).

Pierwsze badania w kierunku terapii genowej mukowiscydozy skupiły się wokół wektorów adenowirusowych (Ad) i adenosatelitarnych (AAV), których serotypy charakteryzują się naturalnym tropizmem do komórek nabłonkowych układu oddechowego. Dla obydwu wektorów wykazano skuteczny transfer genu *CFTR* zarówno w liniach komórkowych, jak i na modelach zwierzęcych (37), co stanowiło podstawę do przystąpienia do badań klinicznych.

Ze względu na wysoką immunogenność wektorów Ad oraz niską wydajność transdukcji komórek dróg oddechowych, nie przeszły one nigdy do trzeciej fazy badań klinicznych. Niska wydajność transdukcji wiąże się z brakiem obecności specyficznych receptorów w błonie apikalnej komórek docelowych. Wzrost wydajności transdukcji uzyskano stosując czynniki otwierające ściśle połączenia międzykomórkowe, jednak ich wykorzystanie w terapii CF niesie ze sobą ryzyko wystąpienia skutków niepożądanych (35).

Wirusy AAV nie są naturalnymi patogenami ludzkimi, jednak badania kliniczne nad wektorem serotypu AAV2 z powtarzanymi dawkami wykazały prawdopodobne działanie immunogenne (38). Kolejną wadą tych wektorów jest ich mała pojemność (9). Nowe strategie rozwoju wydajnego wektora AAV obejmują: 1) rozdzielenie cDNA oraz promotora *CFTR* na dwa nośniki AAV i wykorzystanie metody rekombinacji dwóch wektorów po transfekcji tej samej komórki (38), 2) skrócenie fragmentu cDNA *CFTR* np. części kodującej domenę R (39), 3) usunięcie sekwencji indukujących odpowiedź immunologiczną i zapalną (9) oraz 4) konstrukcję chimericznych kapsydów AAV z serotypów wykazujących większą wydajność transdukcji i ekspresję transgeny (39).

W badaniach podstawowych oceniano również wydajność transdukcji wektorów wirusów RNA: wirusa Sendai (SeV), ludzkiego wirusa RSV oraz ludzkiego wirusa PIV3 (paragrypy). W badaniach na modelach zwierzęcych, do których przeszedł jedynie wektor SeV, obserwowano jednak silną odpowiedź immunologiczną ze strony organizmu modelowego (9).

Aktualnie obiecującą strategią jest wykorzystanie wektorów lentiwirusowych. Są to wirusy zdolne do transfekcji komórek zarówno dzielących, jak i niedzielących się. Wysoką wydajność transdukcji lentiwirusów otrzymuje się tworząc ich pseudotypy, czyli indukując na ich powierzchni ekspresję białek płaszcza innych wirusów np. wirusa VSV-G (pęcherzykowe zapalenie jamy ustnej) czy wspomnianego już wirusa SeV. Pseudotyp SeV, badany na modelu mysim, wykazał długotrwałą ekspresję po pojedynczej dawce oraz wystarczającą dla ewentualnej terapii wydajność transdukcji na poziomie 5% (39). Potwierdzono również co najmniej 12-miesięczną poprawę transportu jonów chlorkowych po pojedynczej dawce wektora lentiwirusowego podanej na nabłonek nosowy myszy z nieaktywnym genem *CFTR* (*CFTR-knockout*) (9). Długotrwała ekspresja, związana z integracją genomu wirusa z genomem gospodarza oraz możliwość stosowania powtórnych dawek terapeutycznych sprawiają, że lentiwirusy są dobrym kandydatem do terapii CF. Zanim jednak przejdą do fazy badań klinicznych, tolerancja, ryzyko mutagenyzy insercyjnej oraz wydajne dostarczenie wektora do komórek układu oddechowego muszą zostać poddane dokładnej ocenie (39).

Komórkami docelowymi w terapii genowej w przypadku mukowiscydozy są przede wszystkim komórki nabłonkowe układu oddechowego. Początkowo płuca wydawały się być nieskomplikowanym celem terapii genowej, biorąc pod uwagę łatwość wprowadzenia nośnika poprzez jego bezpośrednią aplikację na powierzchnię nabłonka (nebulizacja, podanie dooskrzelowe lub wlew do nosa). Jednak wiele barier fizycznych wykształconych przez płuca ogranicza powierzchnię kontaktu nośnika z komórką: wydzielina oskrzelowa, bogata w mucyny i bardzo zagęszczona u pacjentów z CF, rzęski komórek nabłonkowych oraz glikokaliks pokrywający apikalną część komórek (35, 40). Dostarczenie genu jest szczególnie utrudnione u pacjentów z zaawansowaną chorobą płuc (gęsta wydzielina). Dlatego też, terapia genowa powinna być przede wszystkim kierowana do pacjentów młodych z wczesnym rozpoznaniem, u których choroba nie zdążyła się rozwinąć (39). Nie znaczy to jednak, że w innych przypadkach próby dostarczenia prawidłowej kopii genu nie są podejmowane. W niektórych badaniach nad rozwojem terapii genowej stosowano żele lepkosprężyste, które miały na celu wydłużenie czasu styku wektora z receptorami powierzchniowymi (40).

Pomimo coraz większej wiedzy dotyczącej samego procesu dostarczania genów terapeutycznych do wybranych komórek docelowych i ciągłych usprawnień technologicznych, główną przyczyną niepowodzeń badań klinicznych w leczeniu chorych z mukowiscydozą jest indukowana, wrodzona oraz nabyta odpowiedź immunologiczna, która uniemożliwia podawanie kolejnych dawek terapeutycznych (39).

## DOTYCHCZASOWE SUKCESY TERAPII GENOWEJ W INNYCH CHOROBAH

Postęp w dziedzinie inżynierii genetycznej umożliwił znaczące zaawansowanie badań nad terapią genową dla wielu chorób monogenowych (<http://www.wiley.com//>

<http://www.wiley.com//> legacy/wileychi/genmed/clinical/). Niektóre leki oparte na terapii genowej zostały już wprowadzone na rynek (39, materiały informacyjne ze strony internetowej: <http://www.bioworld.com/content/glybera-gains-official-ema-nod-first-gene-therapy-0>).

W 2012 roku Glybera, produkt firmy uniQure BV, został zaakceptowany przez EMA w leczeniu osób z rzadką chorobą dziedziczną – rodzinnym niedoborem lipazy lipoproteinowej (LPLD). Jest to pierwszy lek dopuszczony w Europie, którego działanie opiera się na terapii genowej. W skład Glybery wchodzi wektor z wbudowanym fragmentem genu ludzkiej lipazy lipoproteinowej. Wektor pochodzi od wirusa AAV1. Terapia przeznaczona jest dla dorosłych pacjentów z rozpoznaniem LPLD, potwierdzonym testem genetycznym (Streszczenie Europejskiego Publicznego Sprawozdania Oceniającego (EPAR), dotyczącego leku Glybera: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002145/human\\_med\\_001480.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002145/human_med_001480.jsp&mid=WC0b01ac058001d124)).

Przed Glyberą, w 2003 roku, na rynek medyczny w Chinach został dopuszczony inny lek działający na zasadzie terapii genowej – Gendicine. Jest to lek przeciwnowotworowy, ukierunkowany na terapię pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi, HNSCC (ang. *head and neck squamous cell carcinoma*). Gendicine zawiera wektor Ad5 z wbudowanym supresorem nowotworowym TP53 (41).

W nadchodzącym roku w fazę badań klinicznych wejdą cztery kolejne „leki sierocę” oparte na terapii genowej polegającej na komplementacji defektów: genu kodującego białko IX czynnika krzepnięcia krwi u chorych na hemofilię typu B; genu kodującego deaminazę porfobilinogenu w terapii chorych na ostrą porfirię przerywaną; genu kodującego czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego w leczeniu chorych na Parkinsona oraz genu kodującego alfa-N-acetyloglukozaminidazę w leczeniu pacjentów z chorobą Sanfilippo typu B (Materiały informacyjne ze strony internetowej: <http://www.bioworld.com/content/glybera-gains-official-ema-nod-first-gene-therapy-0>).

## NOWE STRATEGIE TERAPII CF W FAZIE BADAŃ PODSTAWOWYCH

W ostatnich latach podejmowano także próby wykorzystania w terapii genowej CF podejść alternatywnych do komplementacji defektu genetycznego.

Jednym z nich jest korekta wadliwego genu (ang. *gene correction*). Strategia ta polega na wykorzystaniu zjawiska homologicznej rekombinacji sekwencji wprowadzanej z sekwencją wadliwą obecną w genomie. W odróżnieniu od klasycznej terapii genowej w tym przypadku wprowadzany byłby jedynie fragment genu, który docelowo zastąpiłby w genomie homologiczny fragment zawierający mutację. Pierwsze badania nad korektą mutacji F508del w eksonie 10 genu *CFTR* wykazały niską częstość (1,2%) rozcinania DNA w pobliżu tej mutacji przez specyficzne nukleazy palców cynkowych, których sekwencje kodujące były wprowadzone w plazmidach. Kolejne badania będą się skupiały na poprawie wydajności dostarczania



wektorów do komórek oraz wprowadzania złamań w nici DNA i homologicznej rekombinacji (35, 40).

Inna strategia zakłada opracowanie terapii komórkowej opierającej się na komórkach macierzystych, zdolnych do różnicowania i odnawiania swojej populacji. Badania wykazały, że w odpowiednich warunkach komórki macierzyste szpiku kostnego oraz macierzyste komórki mezenchymalne MSC (ang. *mesenchymal stem cells*) mogą różnicować się w komórki zdolne do ekspresji markerów komórek nabłonka układu oddechowego (39). W jednym z badań nad terapią z wykorzystaniem komórek macierzystych w CF przeprowadzono komplementację genu *CFTR ex vivo* w komórkach MSC wyizolowanych od pacjentów z mutacją F508del w układzie homozygotycznym. Nośnikiem genu był wektor wirusa mysiej białaczki Moloney (ang. *Moloney murine leukemia*). Po transfekcji i podaniu cAMP do hodowli tych komórek, zaobserwowano wydzielanie jonów chlorkowych (35, 40).

Niedawno odkryto też nowe populacje komórek macierzystych szpiku kostnego u myszy i ludzi, które wykazują ekspresję markerów komórek Clary, występujących w oskrzelikach, i mają zdolność różnicowania się w różne linie komórek nabłonkowych (39). Być może komórki te będą mogły w przyszłości zostać wykorzystane w terapii chorych na mukowiscydozę.

Mukowiscydoza jest pod wieloma względami modelową chorobą monogenową. Od momentu opisanie jej po raz pierwszy w latach 30-tych XX wieku, dokonał się olbrzymi postęp zarówno w diagnostyce, jak i w jej leczeniu, czego wymiernym efektem jest kilkunastokrotny wzrost średniej długości życia chorych. Zarówno wielokierunkowość, jak i stopień zaawansowania badań nad opracowaniem nowych metod objawowego, jak i przyczynowego leczenia chorych na mukowiscydozę pozwala mieć niemalże pewność, że coraz więcej problemów zdrowotnych związanych z CF zostanie rozwiązanych. Tym niemniej perspektywa czasowa może okazać się długa.

#### Podziękowania

Autorzy pracy pragną serdecznie podziękować Pani Profesor Dorocie Sands za cenne wskazówki i uwagi, które wpłynęły na ostateczny kształt pracy.

#### PIŚMIENNICTWO

- Bożkowska K., Golebiowska H., Rutkowski J., Nowakowska A., Holzer J.: Epidemiology of mucoviscidosis in children in Poland. *Pediatr Pol.* 1971, Jun; 46(6), 677-684.
- Farrell P.M.: The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J. Cyst. Fibros.* 2008, Sep; 7(5), 450-453.
- Flume P.A., Van Devanter D.R.: State of progress in treating cystic fibrosis respiratory disease. *BMC Med.* 2012, Aug 10; 10, 88.
- Pier G.B.: The challenges and promises of new therapies for cystic fibrosis. *J. Exp. Med.* 2012, Jul 2; 209(7), 1235-1239.
- Reeves E.P., Molloy K., Pohl K., McElvaney N.G.: Hypertonic saline in treatment of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Scientific World Journal.* 2012, 2012, 465230.
- Lubamba B., Dhooghe B., Noel S., Leal T.: Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin. Biochem.* 2012, Oct; 45(15), 1132-1144.
- Kreindler J.L.: Cystic fibrosis: exploiting its genetic basis in the hunt for new therapies. *Pharmacol. Ther.* 2010, Feb; 125(2), 219-229.
- Mazurczak T.: Rozdział 6.4 Mutacje. Mukowiscydoza. Instytut Matki i Dziecka, Warszawa 2006.
- Griesenbach U., Alton E.W.: Moving forward: cystic fibrosis gene therapy. *Hum. Mol. Genet.* 2013, Oct 15; 22(R1), R52-58.
- Korf B.: Rozdział 3.8 Leczenie mukowiscydozy. Genetyka człowieka. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2003.
- Sobczyńska-Tomaszewska A., Oltarzewski M., Czerska K., Wertheim-Tysarowska K., Sands D., Walkowiak J., Bal J., Mazurczak T.L.: NBS CF working group. Newborn screening for cystic fibrosis: Polish 4 years' experience with CFTR sequencing strategy. *Eur. J. Hum. Genet.* 2013, Apr; 21(4), 391-396.
- Sands D.: Transepithelial nasal potential difference (NPD) measurements in cystic fibrosis (CF). *Med. Wieku Rozwoj.* 2013, Jan-Mar; 17(1), 13-17.
- François B., Luyt C.E., Dugard A., Wolff M., Diehl J.L., Jaber S., Forel J.M., Garot D., Kipnis E., Mebazaa A., Misset B., Andreumont A., Ploy M.C., Jacobs A., Yarranton G., Pearce T., Fagon J.Y., Chastre J.: Safety and pharmacokinetics of an anti-PcrV PEGylated monoclonal antibody fragment in mechanically ventilated patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Crit. Care Med.* 2012, Aug; 40(8), 2320-2326.
- Griese M., Latzin P., Kappler M., Weckerle K., Heinzlmaier T., Bernhardt T., Hartl D.: alpha1-Antitrypsin inhalation reduces airway inflammation in cystic fibrosis patients. *Eur. Respir. J.* 2007, Feb; 29(2), 240-250.
- Arold S.P., Berry E.L., Rosa D., Saia F.A., Kong S., Wright P.L., Clarke R.W., Hava D.L.: Inhaled cationic salts modulate macrophage function to reduce inflammation during LPS induced lung injury. *Eur. Respir. J.* 2012, 40, Suppl. 56, P2128.
- Wright P.L., Woodman P., Spicer D., Kenyon J., Okerholm P., Russell V., Clarke R.W., Hava D.L.: Inhaled calcium salts reduce expression of inflammatory mediators associated with tobacco smoke exposure to reduce airway inflammation. *Eur. Respir. J.* 2012, 40, Suppl. 56, P2129.
- Clancy J.P., Dupont L., Konstan M.W., Billings J., Fustik S., Goss C.H., Lymp J., Minic P., Quittner A.L., Rubenstein R.C., Young K.R., Saiman L., Burns J.L., Govan J.R., Ramsey B., Gupta R.: Arikace Study Group. Phase II studies of nebulised Arikace in CF patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Thorax.* 2013, Sep; 68(9), 818-825.
- Grasemann H., Tullis E., Ratjen F.: A randomized controlled trial of inhaled L-arginine in patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 2013, Sep; 12(5), 468-474.
- Aitken M.L., Bellon G., De Boeck K., Flume P.A., Fox H.G., Geller D.E., Haarman E.G., Hebestreit H.U., Lapey A., Schou I.M., Zuckerman J.B., Charlton B.: CF302 Investigators. Long-term inhaled dry powder mannitol in cystic fibrosis: an international randomized study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012, Mar 15; 185(6), 645-652.
- Zemanick E.T., Harris J.K., Conway S., Konstan M.W., Marshall B., Quittner A.L., Retsch-Bogart G., Saiman L., Accurso F.J.: Measuring and improving respiratory outcomes in cystic fibrosis lung disease: opportunities and challenges to therapy. *J. Cyst. Fibros.* 2010, Jan; 9(1), 1-16.

21. *Pettit R.S.*: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-modifying medications: the future of cystic fibrosis treatment. *Ann. Pharmacother.* 2012, Jul-Aug; 46(7-8), 1065-1075.
22. *Accurso F.J., Rowe S.M., Clancy J.P., Boyle M.P., Dunitz J.M., Durie P.R., Sagel S.D., Hornick D.B., Konstan M.W., Donaldson S.H., Moss R.B., Pilewski J.M., Rubenstein R.C., Uhler A.Z., Aitken M.L., Freedman S.D., Rose L.M., Mayer-Hamblett N., Dong Q., Zha J., Stone A.J., Olson E.R., Ordoñez C.L., Campbell P.W., Ashlock M.A., Ramsey B.W.*: Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *N. Engl. J. Med.* 2010, Nov 18; 363(21), 1991-2003.
23. *Yu H., Burton B., Huang C.J., Worley J., Cao D., Johnson J.P. Jr, Urrutia A., Joubran J., Seepersaud S., Sussky K., Hoffman B.J., Van Goor F.*: Ivacaftor potentiation of multiple CFTR channels with gating mutations. *J. Cyst. Fibros.* 2012, May; 11(3), 237-245.
24. *Ramsey B.W., Davies J., McElvaney N.G., Tullis E., Bell S.C., Dřevínek P., Griese M., McKone E.F., Wainwright C.E., Konstan M.W., Moss R., Ratjen F., Sermet-Gaudelus I., Rowe S.M., Dong Q., Rodriguez S., Yen K., Ordoñez C., Elborn J.S.*: VX08-770-102 Study Group. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N. Engl. J. Med.* 2011, Nov 3; 365(18), 1663-1672.
25. *Molinski S., Eckford P.D., Pasyk S., Ahmadi S., Chin S., Bear C.E.*: Functional Rescue of F508del-CFTR Using Small Molecule Correctors. *Front Pharmacol.* 2012, Sep 26; 3, 160.
26. *Wieczorek G., Zielenkiewicz P.*: DeltaF508 mutation increases conformational flexibility of CFTR protein. *J. Cyst. Fibros.* 2008, Jul; 7(4), 295-300.
27. *Hanrahan J.W., Sampson H.M., Thomas D.Y.*: Novel pharmacological strategies to treat cystic fibrosis. *Trends Pharmacol. Sci.* 2013, Feb; 34(2), 119-125.
28. *Prickett M., Jain M.*: Gene therapy in cystic fibrosis. *Transl. Res.* 2013, Apr; 161(4), 255-264.
29. *Van Goor F., Hadida S., Grootenhuis P.D., Burton B., Stack J.H., Straley K.S., Decker C.J., Miller M., McCartney J., Olson E.R., Wine J.J., Frizzell R.A., Ashlock M., Negulescu P.A.*: Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011, Nov 15; 108(46), 18843-18848.
30. *Wilschanski M., Miller L.L., Shoseyov D., Blau H., Rivlin J., Aviram M., Cohen M., Armoni S., Yaakov Y., Pugatsch T., Cohen-Cymberknop M., Miller N.L., Reha A., Northcutt V.J., Hirawat S., Donnelly K., Elfring G.L., Ajayi T., Kerem E.*: Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 2011, Jul; 38(1), 59-69.
31. *Welch E.M., Barton E.R., Zhuo J., Tomizawa Y., Friesen W.J., Trifillis P., Paushkin S., Patel M., Trotta C.R., Hwang S., Wilde R.G., Karp G., Takasugi J., Chen G., Jones S., Ren H., Moon Y.C., Corson D., Turpoff A.A., Campbell J.A., Conn M.M., Khan A., Almstead N.G., Hedrick J., Mollin A., Risher N., Weetall M., Yeh S., Branstrom A.A., Colacino J.M., Babiak J., Ju W.D., Hirawat S., Northcutt V.J., Miller L.L., Spatrick P., He F., Kawana M., Feng H., Jacobson A., Peltz S.W., Sweeney H.L.*: PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature.* 2007, May 3; 447(7140), 87-91.
32. *Rowe S.M., Clancy J.P.*: Pharmaceuticals targeting nonsense mutations in genetic diseases: progress in development. *BioDrugs.* 2009, 23(3), 165-174.
33. *Rowe S.M., Sloane P., Tang L.P., Backer K., Mazur M., Buckley-Lanier J., Nudelman I., Belakhov V., Bebok Z., Schwiebert E., Baasov T., Bedwell D.M.*: Suppression of CFTR premature termination codons and rescue of CFTR protein and function by the synthetic aminoglycoside NB54. *J. Mol. Med. (Berl).* 2011, Nov; 89(11), 1149-1161.
34. *Szala S.*: Rozdział 2. Założenia terapii genowej. *Terapia genowa.* Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa, 2003.
35. *Griesenbach U., Alton E.W.*: Expert opinion in biological therapy: update on developments in lung gene transfer. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2013, Mar; 13(3), 345-360.
36. *Eastman S.J., Lukason M.J., Tousignant J.D., Murray H., Lane M.D., St. George J.A., Akita G.Y., Cherry M., Cheng S.H., Scheule R.K.*: A concentrated and stable aerosol formulation of cationic lipid:DNA complexes giving high-level gene expression in mouse lung. *Hum. Gene Ther.* 1997, Apr 10; 8(6), 765-773.
37. *Hida K., Lai S.K., Suk J.S., Won S.Y., Boyle M.P., Hanes J.*: Common gene therapy viral vectors do not efficiently penetrate sputum from cystic fibrosis patients. *PLoS One.* 2011, 6(5), e19919.
38. *Conese M., Ascenzioni F., Boyd A.C., Coutelle C., De Fino I., De Smedt S., Rejman J., Rosenecker J., Schindelhauer D., Scholte B.J.*: Gene and cell therapy for cystic fibrosis: from bench to bedside. *J. Cyst. Fibros.* 2011, Jun; 10 Suppl. 2, S114-128.
39. *Griesenbach U., Alton E.W.*: Progress in gene and cell therapy for cystic fibrosis lung disease. *Curr. Pharm. Des.* 2012, 18(5), 642-662.
40. *Oakland M., Sinn P.L., McCray P.B. Jr.*: Advances in cell and gene-based therapies for cystic fibrosis lung disease. *Mol. Ther.* 2012 Jun; 20(6), 1108-1115.
41. *Räty J.K., Pikkarainen J.T., Wirth T., Ylä-Herttua S.*: Gene therapy: the first approved gene-based medicines, molecular mechanisms and clinical indications. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2008, Jan; 1(1), 13-23.

---

#### Wkład Autorów/Authors' contributions

Według kolejności/According to the order of the Authorship

#### Konflikt interesu/Conflicts of interest

Autorzy pracy nie zgłaszają konfliktu interesów.  
The Authors declare no conflict of interest.

**Nadesłano/Received:** 29.10.2013 r.

**Zaakceptowano/Accepted:** 26.11.2013 r.

---

#### Published online/Dostępne online

Adres do korespondencji:  
Dominika Nesteruk  
Zakład Genetyki Medycznej  
Instytut Matki i Dziecka  
ul. Kasprzaka 17A, 01-211 Warszawa  
tel. (48 22) 32-77-177  
e-mail: dominika.nesteruk@imid.med.pl