

Молекулярные основы создания новых лекарственных средств при муковисцидозе

**Н.И. Капранов¹, Е.И. Кондратьева¹, И.К. Ашерова², Н.В. Петрова¹,
Каширская Н.Ю.¹**

1 ФГБУ «Медико-генетический научный центр РАМН», Москва, Российская Федерация

2 ГУЗ ЯО Детская клиническая больница №1, г. Ярославль, Российская Федерация

Достижения в создании новых технологий терапии хронической болезни легких микробно- воспалительного характера, цирроза и других осложнений и проявлений муковисцидоза позволило значительно увеличить продолжительность жизни и перевело муковисцидоз из разряда «фатальных» в разряд хронических болезней. Однако медиана продолжительности жизни колеблется от 20 лет до 40 и выше в развитых странах.

Интенсивные исследования гена муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости (*CFTR*), его продукт и функция привели к пониманию новых подходов к терапии муковисцидоза (в зарубежной литературе -cystic fibrosis). Ген *CFTR* был идентифицирован в 1989г. в результате генетического анализа и позиционного клонирования двумя группами ученых из Канады и США под руководством Fr. Collins'a и L.-Ch. Tsui'я [1]). Расположен ген *CFTR* на длинном плече хромосомы 7 в области q31, имеет протяженность около 250 т.п.н. и включает 27 экзонов (рис.1)

Продукт гена *CFTR* относится к суперсемейству АТФ-связывающих кассетных протеинов (ABC – АТФ-binding cassette), является трансмембранным белком, располагающимся на поверхности большинства эпителиальных клеток и функционирует как цАМФ-зависимый хлорный канал. Трансмембранный регулятор муковисцидоза (МВТР) состоит из двух мембран-связанных доменов (MSD1 и MSD2), двух нуклеотид-связывающих доменов (NBD1 и NBD2) и центрального, внутриклеточного регуляторного домена (R домен) и участвует в таких процессах, как регуляция других ионных каналов и мембранного транспорта [1, 2, 3].

МВТР осуществляет следующие функции:

1. Секреция жидкости железами подслизистой оболочки, располагающейся под поверхностным эпителием дыхательных путей. Баланс между этими двумя транспортными функциями (абсорбцию ионов хлора (Cl^-) вслед за абсорбцией натрия (Na^+)), необходим для поддержания оптимального объема поверхностной жидкости дыхательных путей для обеспечения цилиарного клиренса от слизи и бактерий.

2. Регуляция транспорта ионов калия (K^+) и кальция (Ca^{2+}) как в тканях легких, так и в тканях органов желудочно-кишечного тракта.

3. Секретирует ион HCO_3^- в поджелудочной железе [4].

4. Участие в процессе воспаления за счет повышения уровня синтеза малонил-КоА, что и нарушает метаболизм жирных [5].

5. Выведение глутатиона (внутри- и внеклеточный антиоксидант - GSH) из клеток дыхательного эпителия для защиты легочной ткани при воздействии высоко реактивных оксигенных микроорганизмов [6].

К настоящему времени мутации обнаружены как в кодирующих, так и в интронных, и в регуляторных частях гена *CFTR*. В нуклеотид-связанных доменах и регуляторном домене мутации выявляются чаще.

Классификация мутаций в гене *CFTR* в зависимости от функциональных последствий.

В зависимости от механизма, нарушающего функцию белка, мутации гена *CFTR* подразделяют на пять классов (табл. 1) [5,7,8,9,10]. Некоторые исследователи выделяют еще один, шестой класс [5,10,11,12, <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>].

В гене муковисцидоза обнаружено около 2000 мутаций, из них около 200-300 дают патологический эффект (<http://www.genet.sickkids.on.ca>). Мутации разных классов оказывают разные эффекты на белок МВТР, что приводит к различной выраженности клинических проявлений. Мутации I-III классов гораздо более серьезно нарушают функцию *CFTR*, чем мутации IV или V классов, и ассоциированы с классическим МВ. При мутациях IV – VI классов функция хлорных каналов поджелудочной железы может быть сохранена, что приводит к поздней манифестации клинических проявлений и диагностике заболевания [5,7,8,11,12,13].

Класс I. Нарушение синтеза протеина. Это мутации, результатом которых является нарушение транскрипции мРНК. К этому классу относятся мутации с наиболее серьезными фенотипическими проявлениями, поскольку синтез белка полностью нарушен. В результате этих мутаций либо нарушается синтез стабильного протеина, либо происходит продукция аномального укороченного протеина вследствие образования кодона терминации. Это нонсенс-мутации, мутации сдвига рамки вследствие делеций или инсерций и мутации, приводящие к альтернативному сплайсингу мРНК [5]. Укороченные молекулы белка обычно нестабильны, узнаются белками-шаперонами в эндоплазматическом ретикулуме и быстро деградируют [13]. Для российской популяции характерна высокая частота так называемой «славянской» мутации CFTRdele2,3(21kb) - 1,4-6,8% (результаты лаборатории генетической эпидемиологии МГНЦ РАМН на 2012 год и данные исследований [2, 14, 15]), для московского региона (по данным регистра 2010 года) -9,02% [16], что может быть предметом поиска модификаторов для данной мутации в стране.

Класс II. Нарушение созревания протеина. Мутации II класса приводят к неправильному сворачиванию молекулы белка и нарушению ее транспорта к апикальной мембране клетки. В результате происходит деградация МВТР молекул в эндоплазматическом ретикулуме: молекула белка не достигает эпителиальной мембраны. Самой распространенной мутацией этого типа является мутация *F508del*. В российской популяции она составляет 33,8-53,5% (результаты лаборатории генетической эпидемиологии МГНЦ РАМН на 2012 год и данные исследований [2, 14, 15]), в московской - 52,96 % [16] и встречается реже, чем в других популяциях 66% (Обследовано 89116 больных МВ хромосом (WHO,2004)). Разработка лекарственных препаратов для коррекции работы хлорного канала при данной мутации является наиболее перспективной, учитывая ее распространенность. Различные миссенс-мутации также приводят к нарушению свертывания молекулы белка. В рекомбинантных клетках не происходит созревания МВТР молекулы до полностью гликозилированной формы или ее выхода из эндоплазматического ретикулума. Эта неправильно сформированная молекула МВТР разрушается посредством внутриклеточного «механизма контроля качества», детали которого пока только изучаются

[13,17,18]. Показано, что у белка МВТР с мутацией *F508del* локализация одинаково нарушена и в эпителиальных клетках дыхательных путей, и в клетках протоков потовых желез. Таким образом, протеин либо отсутствует, либо количество его чрезвычайно снижено в апикальной мембране. В интестинальном, респираторном и гепатобилиарном эпителии больных, гомозиготных по мутации *F508del*, весьма незначительная доля МВТР белка все-таки локализована на апикальной мембране. Некоторые мутации, например *P574H*, приводят к менее серьезному дефекту в сворачивании, чем мутация *F508del*, и в таком случае белок достигает плазматической мембраны и сохраняет некоторую функцию. На основе полученных данных является перспективным воздействие в двух направлениях - на процессы созревания в эндоплазматическом ретикулуме и на продвижение через плазматическую мембрану.

Класс III. Нарушение регуляции хлорного канала. Мутации этого класса приводят к синтезу белка МВТР, который транспортируется к клеточной мембране, но не отвечает на стимуляцию цАМФ [5,12]. Мутации класса III локализованы в нуклеотид-связанных доменах и регуляторном домене МВТР белка. Поскольку внутриклеточный АТФ регулирует открытие МВТР хлорных каналов через прямое взаимодействие с нуклеотид-связанными доменами, мутации в этих доменах могут изменять функцию каналов. В результате мутаций III класса, приводящих к дефектной активации белковых молекул вследствие нарушений связывания АТФ или гидролиза в нуклеотид-связывающих доменах (NBD), на клеточной мембране образуется нормальное количество нефункционального белка. К этому типу относится мутация *G551D*, распространенная в Северной Европе. При мутации *G551D* остаточная функция МВТР канала минимальна, тогда как при мутации *S1255P* она сохраняется в большей мере. Функция белка МВТР также регулируется процессами фосфорилирования регуляторного домена, но, по-видимому, мутаций, относящихся к III классу, в этом домене меньше, чем в других частях гена.

Создание препаратов для этой группы должно быть направлено на регуляцию связывания белка МВТР с АТФ и гидролиза в нуклеотид-связывающих доменах с целью восстановления функции хлорного канала.

Класс IV. Нарушение проводимости хлорного канала. К этому классу, в большей мере, относятся миссенс-мутации, располагающиеся в мембран-связанных доменах. Ген *CFTR*, содержащий эти мутации, кодирует протеин, который нормально транспортируется к клеточной мембране и правильно отвечает на стимуляцию, но генерирует пониженный хлорный поток. Мутации класса IV изменяют ионную проводимость хлорного канала и таким образом уменьшают время открытия каналов и ионный поток. Примерами мутаций этого класса служат замены аргинина на гистидин в положении 117 (R117H), на триптофан в положении 334 (R334W) и на пролин в положении 347 (R347P). Когда эти мутантные МВТР белки экспрессируются в гетерологических эпителиальных клетках, все три правильно претерпевают процессинг, встраиваются в апикальную мембрану, но генерируют сниженный ток. Это обусловлено снижением уровня ионного потока через единичный открытый канал. Кроме того, по крайней мере, для мутации *R117H*, время, в течение которого канал открыт, также снижено. В зависимости от комбинации всех факторов клинический эффект варьирует от практически полного отсутствия клинического заболевания до тяжелой недостаточности функции поджелудочной железы. Согласно исследованиям А. Vankeerberghen с соавторами (1998) ряд мутаций, локализованных в 13 экзоне, кодирующем регуляторный домен, может проявлять разные эффекты на уровень проводимости хлорида. Так уровни активности хлорных каналов мутантных протеинов, *G622D*, *R792G*, *E822K*, снижены по сравнению с *CFTR* дикого типа, тогда как у мутантов *H620Q* и *A800G* активность повышена. Различий в проводимости каналов у мутантов *T665S* и *E826K* по сравнению с диким типом не выявлено. Несколько мутаций в экзоне 18, кодирующем трансмембранный хеликс 12 и соответствующую внутрицитоплазматическую петлю, также относятся к классу IV. Для протеинов с мутациями *M1137V*, *I1139V*, *M1140del*, *D1152H*, *D1154G* показан значительно сниженный цАМФ-активированный ток хлоридов [19]. Мишенью для препаратов данного класса может быть активация тока ионов хлора, как через хлорные, так и альтернативные каналы.

Класс V. Снижение количества функционального белка. К классу V относятся мутации, при которых продуцируется пониженное количество

нормального транскрипта, или снижается уровень функционального белка, или понижен уровень транспорта молекул белка CFTR. Мутации этого класса нарушают механизм сплайсинга, и транскрипты образуются как в результате абберрантного, так и нормального сплайсинга. Уровень нефункциональных и нормальных молекул MBTP варьирует у разных пациентов и в разных тканях одного и того же больного. Например, это миссенс-мутация, *A455E* (замена аланина на глутаминовую кислоту), мутация *3849+10kbC-T* (образование скрытого сайта инициации транскрипции, в результате чего происходит синтез мРНК с дополнительным экзоном, кодирующим 38 аминокислотных остатков), политимициновая последовательность и полиморфные TG повторы в 8 интроне, *IVS8Tn(TG)n* (регулирующая сплайсинга экзона 9). Поскольку во всех этих случаях небольшое количество полноразмерной мРНК продолжает синтезироваться, эти мутации приводят к мягкому фенотипу. Предполагаемые мутации в промоторе гена *CFTR* могут обладать сходным эффектом, снижая уровень транскрипции [12]. Воздействие на процесс сплайсинга – потенциально может использоваться для корректировки нарушений при данном виде мутации.

Класс VI. Сниженная стабильность протеина. Этот относительно новый класс мутаций был выделен и описан J. Zielenski (2000). Этот класс включает мутации, приводящие к синтезу протеина с измененной стабильностью в результате потери С-концевых 70-98 аминокислотных остатков. Хотя С-конец не является необходимым для биогенеза и функционирования CFTR хлорного канала, авторы указывают, что он важен для поддержания стабильности полностью гликозилированной молекулы белка CFTR. Наименьшее укорачивание протеина, приводящее к МВ с панкреатической недостаточностью и хронической легочной инфекцией, описано при мутации *Q1412X*, при этом происходит потеря 70 последних аминокислотных остатков. Панкреатическая недостаточность является маркером тяжелой формы МВ, к сходной тяжелой клинической картине приводят делеции последних 81, 97 и 101 аминокислотного остатка в результате мутаций сдвига рамки (*4326delTC*, *4279insA* и *4271delC*, соответственно) [12]. Было показано, что уровень экспрессии и локализация С-терминальных мутантных протеинов не отличается от CFTR протеина дикого типа. Более того, цАМФ-стимулированный ток через укороченные протеины сохраняет

характеристики CFTR дикого типа, что показывает отсутствие действия последних 26 аминокислотных остатков на функцию хлорного канала CFTR (Haardt M. et al., 1999). Анализ биосинтетического процессинга показал, что последние 82 аминокислотных остатка молекулы CFTR не имеют существенного значения для пост-трансляционного скручивания (фолдинга), но время полужизни полностью гликозилированного укороченного CFTR протеина снижено в 5-6 раз. Это предполагает, что именно пониженная биологическая стабильность укороченных вследствие мутаций VI класса MBTP молекул приводит к MB фенотипу[20]. Примером мутации этого класса является и мутация *S1455X*, описанная R. Eraud с соавторами [2005], первым симптомом MB у больного с этой мутацией явилась стойкая гипонатриемия в течение жаркого лета 2003 г. во Франции.

Таким образом, мутации разных классов оказывают разные эффекты на белок MBTP. В общем, мутации I-III классов гораздо более серьезно нарушают функцию MBTP, чем мутации IV или V классов. Следует отметить, что одна и та же мутация может быть связана более чем с одним механизмом нарушения функции MBTP канала: так мутация *G551D*, как мутация III класса, нарушает активацию хлорного канала, а как мутация IV класса – свойства CFTR регулировать другие ионные каналы [5,7,8,11,12]. Все выше сказанное определяет следующие подходы к созданию лекарственных препаратов:

1. генная терапия: цель - восстановить функцию CFTR путём введения нормальной копии гена *CFTR* в клетки дыхательных путей реципиента посредством векторов;
2. приоритет поиска определяется тяжелыми мутациями, предрасполагающими к тяжелому течению заболевания,
3. частота мутации *F508del* во всех популяциях определяет стратегию разработки лекарственных средств для коррекции нарушений при данной мутации,
4. с учетом, что при ряде мутаций имеет место нарушение нескольких механизмов от синтеза белка до нарушения проходимости хлорных каналов, то разрабатываются как потенциаторы, так и корректоры, а так же создаются

комбинированные препараты с различными точками приложения их действия (сочетание потенциаторов и корректоров),

5. терапия, направленная на другие патофизиологические механизмы заболевания при всех видах мутаций: воздействие на ионный транспорт через эпителиальный натриевый канал для коррекции жидкостных и ионных нарушений, минуя CFTR каналы; использование осмотических средств для улучшения гидратации поверхности дыхательных путей путём изменения осмотического градиента.

Таким образом, в настоящее время новые терапевтические стратегии, основанные на понимании функции хлорного канала и белка МВТР, продолжают активно развиваться и описаны ниже.

Опыт создания новых лекарственных средств для терапии муковисцидоза

Следует отметить, что базисная терапия муковисцидоза фокусируется в настоящее время на компенсации нарушений функционирования системы пищеварения и замедлении прогрессирования патологических изменений в респираторной системе вследствие снижения активности МВТР. Панкреатическая недостаточность хорошо компенсируется заместительной терапией ферментами, потреблением высококалорийной, богатой жирами диетой. Внимательное отношение к питанию больного во все периоды жизни ведёт к улучшению здоровья больных в целом. Хроническое лечение болезни лёгких, обусловленное муковисцидозом, нацелено на улучшение клиренса бронхиального дерева, подавление хронической бактериальной инфекции и местного хронического воспаления.

Муковисцидоз явился одним из первых заболеваний, при котором начались разработки по генной терапии. Вскоре после идентификации гена МВТР появилась надежда, что инсерция нормальной копии гена МВТР восстановит функцию МВТР у больных МВ [21]. Наиболее вероятной тканью-мишенью является респираторный эпителий. Нормализация активности МВТР должна быть осуществлена до развития необратимых функциональных и структурных изменений. Однако на пути реализации этой задачи есть ряд серьёзных ограничений. Патофизиологические последствия нарушения МВТР в различных

органах реализуются в разные сроки. Так, фиброз экзокринной части поджелудочной железы происходит внутриутробно и к рождению, практически завершён. Поэтому восстановление функции МВТР даже в неонатальном периоде вряд ли приведёт к сохранению функции поджелудочной железы в последующем. В то же время респираторный тракт к рождению остаётся относительно сохранным и восстановление активности МВТР у младенцев могло бы иметь отчётливый эффект на развитие заболевания лёгких [22].

Генная терапия. Разрабатывалось несколько систем переноса генов - эффективных векторов – рекомбинантный аденовирусный вектор, аденоассоциированные вирусные векторы (парвовирусы), катионный липидный комплекс (липосомы). Однако оказалось, что в респираторном тракте существует значительно больше препятствий для успешной генной терапии, нежели в большинстве других органов. Надежды, связанные с генотерапией, не оправдались в связи с низким уровнем переноса генной конструкции в эпителиальные клетки, невысоким уровнем и преходящим характером экспрессии гена, развитием иммунного ответа на белок вектора, а также вследствие местных и системных воспалительных реакций [23].

В то же время, на сегодня ясно, что транспорт гена МВТР возможен и частичная коррекция его дефекта в дыхательных путях также может быть осуществлена без серьёзных нежелательных явлений [24]. Теперь требуются доказательства, что транспорт гена МВТР в лёгкие приведёт к клиническому улучшению. Консорциум по генной терапии Великобритании был образован в 2001 году, в него вошли: Оксфордский Университет (Gene Medicine Group), Эдинбургский Университет (Centre for Molecular Medicine и Roslin Institute), Лондонский колледж (Department of Gene Therapy National Heart and Lung Institute). Консорциум создан для оптимизации введения исследований в данном направлении. Начато исследование первого продукта консорциума для клинических исследований GL67A/pGM169, который является комбинацией липосомы (cationic liposome) (GL67A) и плазмиды *DNA expressing CFTR* (pGM169). В настоящее время идет набор пациентов для клинического исследования (слепое, плацебо контролируемое). Препарат или плацебо будут

вводиться 1 раз в месяц через небулайзер, результаты ожидаются к середине 2014 года (<http://www.cfgenetherapy.org.uk/>).

Модификаторы последствий мутаций гена *CFTR*

Хотя в настоящее время задача полной замены мутантного гена нормальной копией является сложной и продолжаются поиски в данном направлении, но идентифицированы малые молекулы, способные модифицировать мутантный белок МВТР. Поиск молекул, способных стимулировать синтез, транспорт или функции неполноценного белка *CFTR* представляется более перспективным. Возможность терапевтических мероприятий способами, определяемыми классом мутации, в настоящее время является горячей темой для обсуждения.

Известно мутации классифицируются в зависимости от основного дефекта (нарушение синтеза, процессинга, регуляции, проводимости канала). Однако эта градация не является высоко специфичной и ряд мутаций может быть отнесено к нескольким группам [25].

Препараты для I группы мутаций

Специфический тип мутаций, называемый нонсенс-мутациями (образование преждевременного кодона терминации в результате замены азотистого основания ДНК) приводит к сокращению количества МВТР белка на поверхности клеточной мембраны. Для пациентов, имеющих нонсенс-мутации (мутации I класса) требуются вещества, способствующие "прочитыванию" стоп-кодонов в *CFTR*-mRNA и предотвращению преждевременной терминации синтеза молекулы белка. В общей популяции больных МВ нонсенс-мутации встречаются в 10% случаев [26]. В Израиле этот тип мутаций обуславливает большинство случаев МВ. Аминогликозидные антибиотики были первыми препаратами, продемонстрировавшими *in vitro* восстановление продукции белка МВТР. Назальная инстиляция гентамицина показала достоверное улучшение базальной разности потенциалов и секреции хлоридов в сравнении с группой плацебо [27]. Однако этот результат был строго специфичен для больных с мутациями I класса. В этом исследовании преобладала т.н. еврейская мутация W1282X. В контрольной группе больных, гомозигот по мутации F508del, подобных изменений получено не было. Sermet-Gaudelus с соавторами сообщили

о сходных результатах системного применения гентамицина у шести из девяти пациентов, носителей мутации Y122X [28]. Однако в обоих исследованиях были пациенты, которые не ответили на терапию гентамицином. Ответ на гентамицин был обнаружен только у пациентов с высоким уровнем транскриптов [29].

В настоящее время компанией PTC Therapeutics, Inc активно исследуется молекула PTC124 (Аталурен), способствующая «прочитыванию» стоп-кодонов в CFTR-mRNA и предотвращению преждевременной терминации синтеза молекулы белка. Молекула PTC124 предназначена для лечения пациентов, имеющих нонсенс-мутации (мутации I класса). В отличие от гентамицина она не обладает антибактериальной активностью и биодоступна при приёме через рот. Во второй фазе клинических исследований было продемонстрировано достоверное изменение транспорта хлоридов, оцениваемое по изменению разности назальных потенциалов у половины больных [29]. Эти изменения были сопряжены со скромным, но достоверным улучшением лёгочной функции и прибавкой массы. Результаты недавнего 12 недельного исследования аталурена (PTC124) у 19 пациентов, носителей как минимум одной нонсенс мутации, показали время зависимое повышение активности MBTP, улучшение клинико-функциональных показателей и хорошую переносимость [31,32]. В 2010 году закончен набор пациентов 6 лет и старше в 48 недельное исследование, проведенное в США и Израиле, целью которого является подтверждение улучшения функции легких при его применении. Продемонстрирована безопасность и улучшение биологических показателей (http://www.cff.org/research/DrugDevelopmentPipeline/#CFTR_MODULATION).

8 июня 2012 года на Конференции Европейского Общества муковисцидоза в Дублине (Ирландия) компания PTC Therapeutics, Inc. объявила результаты 3 этапа клинических исследований аталурена (ataluren), исследователем новом препарате, у пациентов с нонсенс мутацией муковисцидоза. Этап 3 проводился в 11 странах в виде двойного слепого, плацебо-контролируемого исследования по сравнению данных в группе аталурена (n=116) с группой плацебо (n=116) у nmCF пациентов (нонсенс-мутации муковисцидоза). Первичной точкой контроля было относительное изменение от исходного уровня в % прогнозируемого ОФВ1 в течение 48 недель; была показана позитивная динамика в пользу аталурена по

сравнению с плацебо; еще больший эффект наблюдался у больных, не получающих хронически ингаляционные антибиотики изначально, на начальном этапе исследования. Эффект ингаляционных антибиотиков был в значительной степени связан с использованием ингаляционных аминогликозидов. В популяции предполагаемого лечения была отмечена 3% разница в относительном изменении от исходного уровня в % прогнозируемого ОФВ1 между группами на 48 неделе ($p=0.124$). Значительный эффект лечения был замечен в подгруппе больных, не получающих хронически ингаляционные антибиотики в начале исследования; у этой части пациентов на 48 неделе разница между группой аталурен и плацебо по ОФВ1 составила 6,7%. Вторичный показатель: уровень легочных осложнений (число легочных осложнений за 48 недель) также показал положительную тенденцию в пользу группы аталурена, с темпом развития осложнений в группе аталурена на 23% ниже, чем в группе плацебо ($p=0,0992$). Зарегистрировано, что у пациентов, не получающих хронически ингаляционные антибиотики, уровень обострений легких в группе аталурена было на 43% ниже, чем в группе плацебо. Эти результаты показывают стойкий эффект лечения аталуреном, как на изменение функции легких, так и на уровень развития легочных обострений. (<http://www.medpoisk.ru/cf/ataluren.html>).

Модуляторы доставки белка МВТР к апикальной мембране и функции хлорного канала. Для фармакологического моделирования ионного транспорта разрабатываются, так называемые корректоры и потенциаторы [33,34]. Корректоры - лекарственные вещества, позволяющие мутантному белку CFTR пройти через систему внутриклеточного качественного контроля и занять правильное расположение на апикальной мембране (мутации II класса) - 4-фенилбутират/генистин, аналог силденафила-КМ11060, куркумин, VX-809, VX-661.

Мишенью для потенциаторов являются молекулы мутантного белка CFTR, располагающиеся в апикальной мембране. Действие потенциаторов направлено на восстановление (активацию) функции ионного канала, образованного мутантным белком CFTR (мутации III-IV классов). - Генистин; VX-770. Оценка эффективности модуляторов МВТР основана на определении способности

молекул увеличивать количество белка МВТР на поверхности эпителиальной клетки и/или усиливать его функцию.

Созданием препаратов с моделирующими функциями занимается компания Vertex Pharmaceuticals Incorporated (Nasdaq: VRTX) при помощи Фонда помощи больным муковисцидозом (Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics - CFFT). Цели компании Vertex – поиск, разработка и производство новых терапевтических препаратов, улучшающих жизнь людей при тяжелых заболеваниях, как муковисцидоз (www.vrtx.com). Vertex была основана более 20 лет назад в Кембридже, штат Массачусетс и проводит исследования в США, Великобритании и Канаде.

Первый одобренный к применению потенциатор - ивакафтор (Калидеко, VX-770), показан для пациентов со специфической мутацией *G551D*, приводящей к ограничению способности открытия МВТР канала. При данной мутации количество белка МВТР достаточно, но работа канала нарушена. Ивакафтор потенцирует работу канала увеличением способности его к открытию [35]. Препарат выпускается в таблетированной форме по 150 мг, принимается 1 раз в день, что способствует комплаентности пациентов и сокращению многокомпонентной терапии. Клинические исследования пациентов, имеющих хотя бы одну мутацию *G551D*, демонстрировали снижение уровня хлоридов пота в среднем со 100 mEq/L до 51 mEq/L [36]. Что более важно, отмечено существенное клиническое улучшение, сопровождающееся увеличением объема форсированного выдоха за одну секунду на 10,6% должных значений, снижение риска лёгочных обострений на 55%, прибавку массы и улучшение качества жизни [36]. Эффективность сохранялась в течении 48 недель по стабильности содержания Cl⁻ в поте, количества обострений, веса и FEV1. (<http://clinicaltrials.gov> (NCT00909532)).

Сходные результаты были достигнуты и в педиатрической популяции, в результате чего ивакафтор был одобрен FDA для пациентов шести лет и старше. 29 августа 2012 Американское Управление по контролю за продуктами и лекарствами (FDA) уведомило о потенциальной возможности развития катаракты у детей, больных муковисцидозом, которые получают препарат Калидеко (Kalydeco™). Пока остаётся открытым вопрос, можно ли использовать препарат у

вновь выявленных младенцев и будет ли препарат активным при других мутациях, регулирующих функцию хлорного канала, а также будет ли препарат эффективен в отношении других проявлений заболевания, таких как мальабсорбция, риносинусит, уменьшение воспаления в дыхательных путях. Следует отметить, что в базе данных ДНК российской популяции данная мутация не содержится.

К сожалению ивакафтор не эффективен у больных, гомозиготных по мутации *F508del* [37]. Впрочем, это не явилось неожиданностью, так как мутация *F508del* нарушает процессинг МВТР, существенно снижая его количество на поверхности эпителиальных клеток. С увеличением доставки белка МВТР на поверхность клетки с помощью корректоров, ивакафтор, как потенциатор, смог бы повысить его активность. Многообещающим агентом, позволяющим коррегировать дефект процессинга МВТР, вызванный мутацией *F508del* являются молекулы VX-809 и VX-661 [38,39]. Логика комбинации молекулы VX-770 с VX-809 или VX-661 понятна, так как белок МВТР перемещается к апикальной поверхности эпителиальной клетки и затем активируется потенциатором.

Испытание Фазы 2 корректора - VX-809 было начато весной 2009 ч целью оценить безопасность, толерантность, фармакокинетику и фармакодинамику препарата у лиц с мутацией *F508del*. Препарат VX-809, представляющий собой биодоступный при приёме *per os F508del* - корректор, прошёл вторую фазу плацебо контролируемого исследования в группе пациентов, гомозиготных по мутации *F508del*. В результате был продемонстрирован рост МВТР активности и снижение хлоридов в потовой жидкости в группе, получающей препарат [31].

В рамках сотрудничества CFFT – Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics CFFT некоммерческая компания по разработке лекарств, аффилированная с Фондом помощи больным муковисцидозом (CF Foundation) предоставил в 2011 году компании Vertex до 75 миллионов долларов США для поддержки научно-исследовательских работ в течение пяти лет. Компания Vertex начала клиническое испытание фазы 2 для VX-661 с 2011 г. В исследование были включены больные с мутацией *F508del*.

Кроме того, в рамках этого сотрудничества предполагается производить ускоренный поиск и ранние этапы исследований корректоров следующего поколения, направленных на лечение причины МВ у больных с мутацией *F508del*.

В рамках предыдущих программ сотрудничества CFFT имеет право на получение отчислений от выручки, полученной от будущих продаж VX-770, VX-809 и VX-661. Права на препараты VX-770, VX-809 и VX-661 по всему миру сохраняются за Vertex.

В настоящее время комбинация VX-809 и VX-661 с ивакафтором (VX-770), исследуется у больных с мутацией *F508del* [40,41]. На 26-й ежегодной Североамериканской конференции по муковисцидозу в Орlando были представлены подробные данные испытания фазы 2 (2009-2012), подтверждающие положительное влияние комбинации VX-809 и Kalydeco (VX-770) на функцию легких. Найдена наиболее эффективная доза препарата VX890 - 600 мг и VX-770 -250 мг, при которых достигнуто максимальное улучшение показателя ОФВ1 в группе терапии на 3,4% и снижение в группе плацебо на 3,3% за 56 дней терапии. В 2013 начинается 3 фаза исследований для мутаций: *F508del// F508del* и *F508del/* любая другая.

В настоящее время идет набор пациентов для 2 фазы исследования корректора - VX-661 в сочетании с Kalydeco (VX-770) для пациентов с мутациями *F508del// F508del*.

Таким образом, следует ожидать, что в ближайшее время, может быть сделан существенный прорыв в изменении подходов к терапии МВ и повышения ее эффективности.

Активаторы альтернативных хлорных каналов. МВТР не единственный канал эпителиальной клетки, ответственный за поддержание уровня и состава жидкости, покрывающей эпителий. Существуют альтернативные хлорные каналы, включая кальций-зависимый и P2Y – рецептор, активируемый АТФ [42,43]. Два препарата оказались в поле зрения исследователей: денуфозол, стимулирующий секрецию хлоридов [44], и Ланковутид (Moli1901), продемонстрировавший улучшение разности назальных потенциалов при нанесении на слизистую носа [45].

Ранние исследования уридин-5-трифосфата, аналога АТФ выявило короткий период полужизни, ограничивающий его клиническое применение [46]. Последующий аналог денуфозол показал большую стабильность и ранние исследования были многообещающими. Помимо исправления дефекта ионного транспорта за счёт усиления секреции хлоридов через Ca активируемые хлорные каналы, дефуназол ингибирует абсорбцию натрия, воздействуя на эпителиальные Na каналы, стимулирует усиление частоты биения ресничек. Исследование TIGER1 (Transport of Ions to Generate Epithelial Rehydration study) продемонстрировало улучшение лёгочной функции. В данном исследовании приняли участие 352 пациента с муковисцидозом в возрасте старше 5 лет (средний возраст 14,6 года) с $ОФВ_1 \geq 75\%$ (в среднем 92% от должного). Часть из них получали ингаляции денуфозола 60 мг 3 раза в день в течение 48 недель [47]. В то же время второе, плацебо контролируемое исследование TIGER2, в которое были включены 466 пациентов, средний возраст которых составил 15,1 года, не подтвердило полученные результаты и дальнейшие исследования были приостановлены [48]. Фармакокинетические данные показали, что денуфозол имел относительно короткий период полужизни (17 минут), значительно короче ожидаемого в ходе изучения *in vitro*. Возможно, с этим связана неудача исследования. В то же время не исключено, что денуфозол способен снизить скорость падения лёгочной функции без её улучшения (<http://www.medpagetoday.com/Pulmonology/GeneralPulmonary/24154>).

Ланковутид увеличивает уровень внутриклеточного кальция и активирует альтернативные хлорные каналы [49]. Клинические испытания продемонстрировало улучшение проводимости хлоридов, путём измерения разности назальных потенциалов у больных МВ и одноцентровое клиническое исследование 24 пациентов с МВ показало безопасность препарата и эффективность относительно лёгочной функции [50]. Тем не менее, дальнейших исследований этого препарата не последовало.

Ингибировать абсорбцию натрия – ещё одна функция белка МВТР. Его отсутствие приводит к избыточной абсорбции натрия и воды через эпителиальные натриевые каналы. Уменьшение абсорбции натрия является альтернативным методом лечения. В связи с этим определённые надежды возлагались на аэрозоль

амилорида, блокатора эпителиальных натриевых каналов. Однако подтвердить его клиническую эффективность не удалось [51]. Не исключено, что другие каналы имеют большее значение в формировании болезни лёгких при МВ или причина в его низкой стабильности.

В целом, в настоящее время вопрос об эффективности и безопасности активаторов альтернативных хлорных каналов остается открытым.

Средства, регулирующие осмотический градиент. Другим возможным терапевтическим подходом может быть восстановление объёма жидкости на поверхности эпителия дыхательных путей. В основе повышения эффективности мукоцилиарного клиренса - улучшение гидратации поверхности дыхательных путей за счёт изменения осмотического градиента [52]. Ингаляция гипертонического раствора (ГР) хлорида натрия приводит к увеличению концентрации ионов в жидкости, покрывающей реснитчатый эпителий, способствует гидратации слизи, улучшая клиренс дыхательных путей. Поскольку эффект от ингаляции гипертонического раствора отмечается в первые 60 минут вследствие быстрой абсорбции, увеличение объёма жидкости, покрывающего эпителий дыхательных путей, а соответственно и улучшение мукоцилиарного клиренса является краткосрочным явлением [53]. Ещё в 2005 году Cochrane Systematic Review сообщало о недостатке доказательств для использования гипертонического раствора в рутинной практике [54]. Однако в 2010 году появились сообщения о других эффектах гипертонического раствора: способности разрушать комплекс ДНК/мукопротеин, увеличивать содержание glutathione (GSH) and thiocyanate (SCN) – протективных антиоксидантных CFTR – зависимых тиолов [55]. Небулизация ГР нарушает взаимодействие ИЛ-8 с гюкозоаминогликанами, делая его доступным для протеолиза, уменьшая хемотаксис нейтрофилов, способствуя тем самым разрешению воспаления [56].

Гипертонический раствор демонстрирует и другие клинические преимущества. Ингаляция 7-8% гипертонического раствора хлорида натрия улучшает неравномерность вентиляции у больных МВ с нормальными показателями спирометрии, снижает уровень маркёров воспаления в мокроте, риск лёгочных обострений, незначительно улучшает лёгочную функцию [57,58,59,60]. Частота и концентрация могут влиять на результаты ингаляций. В

то же время, недавнее большое рандомизированное 48-недельное мультицентровое исследование у детей младше 6 лет не показало уменьшения числа обострений в группе лечения [61]. Серьёзным недостатком гипертонического раствора считается низкая толерантность из-за усиления кашля и бронхоспазма [62]. Ингаляции гипертонического раствора у ряда пациентов должно предшествовать введению ингаляционных бронходилататоров.

Другим альтернативным осмотическим агентом, способным накапливать воду в жидкости, выстилающей эпителий дыхательных путей и присутствовать на поверхности более длительное время является маннитол. Недавно была изучена эффективность ингаляционной формы маннитола в виде сухой пудры у больных с МВ и бронхоэктазами иного происхождения. Как и в случае с гипертоническим раствором хлорида натрия, улучшение клиренса дыхательных путей отмечено в первые 45 минут, после чего его показатели оставались неизменными при всех тестируемых дозах [63]. Результатами клинических исследований явилось достоверное повышение ОФВ₁, уменьшение обострений в группе больных, получавших маннитол, что было подтверждено и в открытой фазе исследования. 14% пациентов исключены из исследования из-за нежелательных явлений (кашель, кровохарканье, бронхоспазм, фарингеальная боль) [64]. Опасения относительно, того, что маннитол способствует росту *V.separia* не подтвердились.

Ещё один представитель сахаров с низкой трансэпителиальной проницаемостью, ксилитол, также действует, как осмолярный агент, сходный с маннитолом. Ранние исследования показали безопасность у мышей, здоровых добровольцев и стабильных пациентов с МВ при назначении однократно в день [65]. В настоящее время проводятся сравнительные исследования безопасности и эффективности ингаляционного ксилитола с гипертоническим раствором [66].

Респираторная инфекция, воспаление, мукоцилиарный клиренс, нутритивный статус, уменьшение обострений, состояния напрямую связанные с лёгочной функцией, являются также целями лечения МВ и продолжают активно разрабатываться. Однако поликомпонентная терапия является дорогостоящей, значительно влияет на качество жизни больного, не лишена побочных эффектов. Улучшение клинического статуса, выживаемости больных МВ, является и результатом развития терапевтических стратегий, и в будущем связывается с

пониманием молекулярных механизмов развития заболевания и возможностью их коррекции.

Таблица 1

Классы мутаций в гене *CFTR* и мишени для разработки лекарственных препаратов

Класс	Класс I	Класс II	Класс III	Класс IV	Класс V	Класс VI
Нарушение в молекуле белка <i>CFTR</i> *	Нарушение синтеза протеина	Нарушение процессинга или транспорта	Нарушение регуляции	Снижение проводимости	Снижение уровня нормальных молекул белка или РНК	Снижение стабильности протеина
Мутации гена <i>CFTR</i> *	G542X W1282X R553X 621+1C>T 2143delT 1677delTA CFTRdele2,3(21kb)	F508del N1303K I507del S549I S549R	G551D G1244E S1255P	R334W R347P R117H	3849+10kbC>T A455E IVS8(5T) 1811+1,6kbA>G	S1455X
Клинические проявления	С рождения тяжелое течение, полиорганность поражения			Поздняя манифестация, сохранена функция поджелудочной железы		Тяжелое течение
Мишень для лекарственной терапии	Синтез белка	Мутация F508del Синтез белка Продвижение белка по хлорному каналу	Мутации в нуклеотид-связанных доменах Восстановление ионной проводимости хлорного канала и увеличение времени открытия каналов и ионного потока	Миссенс-мутации, располагающиеся в мембран-связанных доменах и регуляторном домене <i>CFTR</i> белка. Восстановление ионной проводимости хлорного канала и увеличение времени открытия каналов и ионного потока	Увеличение количества нормального транскрипта, или повышение уровня функционального белка, или уровня транспорта молекул белка <i>CFTR</i>	Восстановление синтеза С -концевых аминокислотных остатков
Молекулы и препараты	Гентамицин PTC124 (Аталурен) – 3 фаза	Корректоры + Потенциаторы VX-770 и VX-809 – 3 фаза; VX-770 VX-661 -2 фаза.	Потенциатор VX-770, в клинической практике	Потенциаторы хлорных каналов и альтернативных	Исследования не опубликованы или не ведутся	
Воздействие на общие механизмы нарушений мукоцилиарного клиренса	Активаторы альтернативных хлорных каналов - кальций зависимый (денуфозол) и P2Y – рецептор (Ланковутид (Moli1901) –клинические испытания приостановлены Средства, регулирующие осмотический градиент (гипертонический раствор натрия хлорида, маннитол) – используются в клинической практике (уровень доказательности B)					

Примечание: * на основе данных литературы (Welsh M.J., Smith A.E.,1993; Kerem B.S., Kerem E., 1996; Castellani C. et al., 2008, Zielenski J., 2000; Witt H., 2003; Rowntree R.K., Harris A., 2003; Mishra A. et al., 2005).

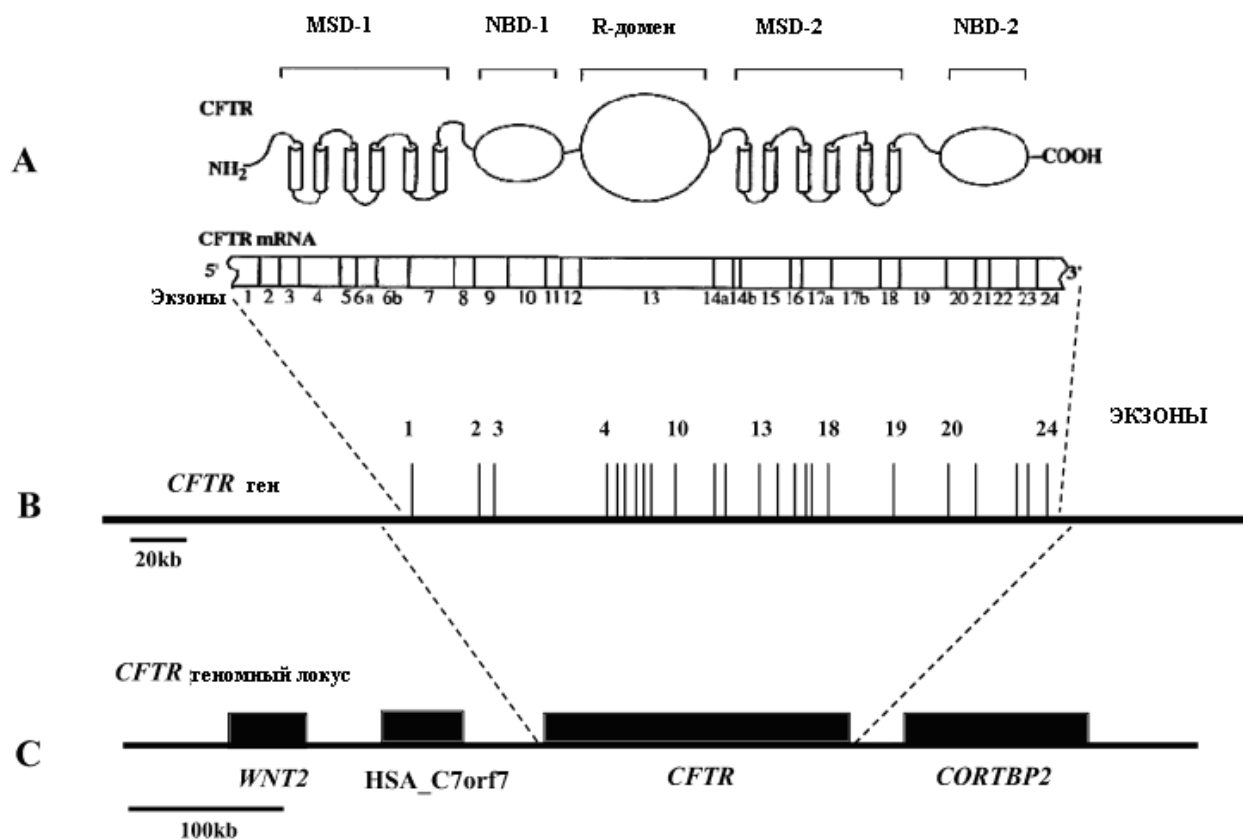


Рис. 1. Структура локуса, гена, мРНК и белка CFTR. А. мРНК и белок CFTR, MSD1 и MSD2 – мембран связанные домены, NBD1 и NBD2 – нуклеотид связывающие домены; В. Ген *CFTR*, экзоны обозначены вертикальными линиями; С. геномный локус, гены обозначены горизонтальными блоками (Rowntree R.K., Harris A., 2003).

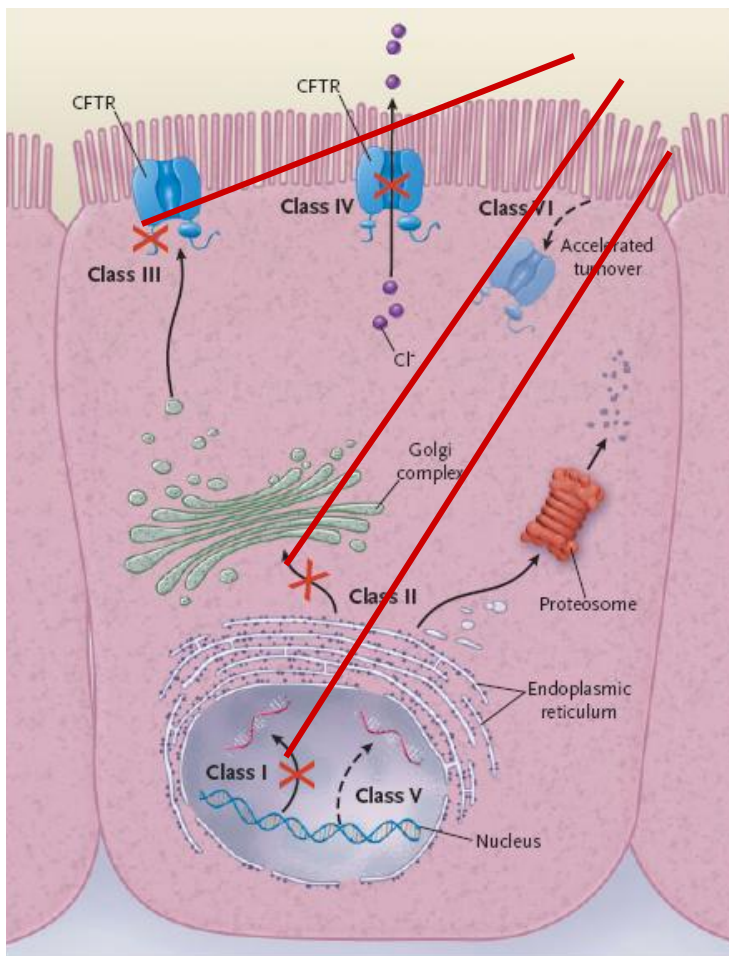


Рис 2. CFTR - модуляторы (Rowe SM et al., New Engl J Med 2005)

1. Потенциаторы – мишенью данных препаратов являются молекулы мутантного белка CFTR, располагающиеся в апикальной мембране. Действие потенциаторов направлено на восстановление (активацию) функции ионного канала, образованного мутантным белком CFTR (мутации III-IV классов) - Генистин; Калидеко (VX-770).

2. Корректоры – лекарственные средства, позволяющие мутантному белку CFTR пройти через систему внутриклеточного качественного контроля и занять правильное расположение на апикальной мембране (мутации II класса) - 4-фенилбутират/генистин; аналог силденафила-КМ11060; куркумин; VX-809
 3 Вещества, способствующие «**прочтыванию**» **стоп-кодонов** в CFTR-mRNA и предотвращению преждевременной терминации синтеза молекулы белка, используются при лечении пациентов, имеющих нонсенс-мутации (мутации I класса). – Аталурен (PTC124).