



Centro Regionale Toscano
di riferimento
per la Fibrosi Cistica



Dipartimento di Attività Integrate in Pediatria Internistica
Azienda Ospedaliero-Universitaria A. Meyer



**Nuovi farmaci per il difetto
di base della fibrosi cistica**

Giugno 2012

www.fibrosicisticatoscana.org - Newsletter N. 1 – 29 Giugno 2012

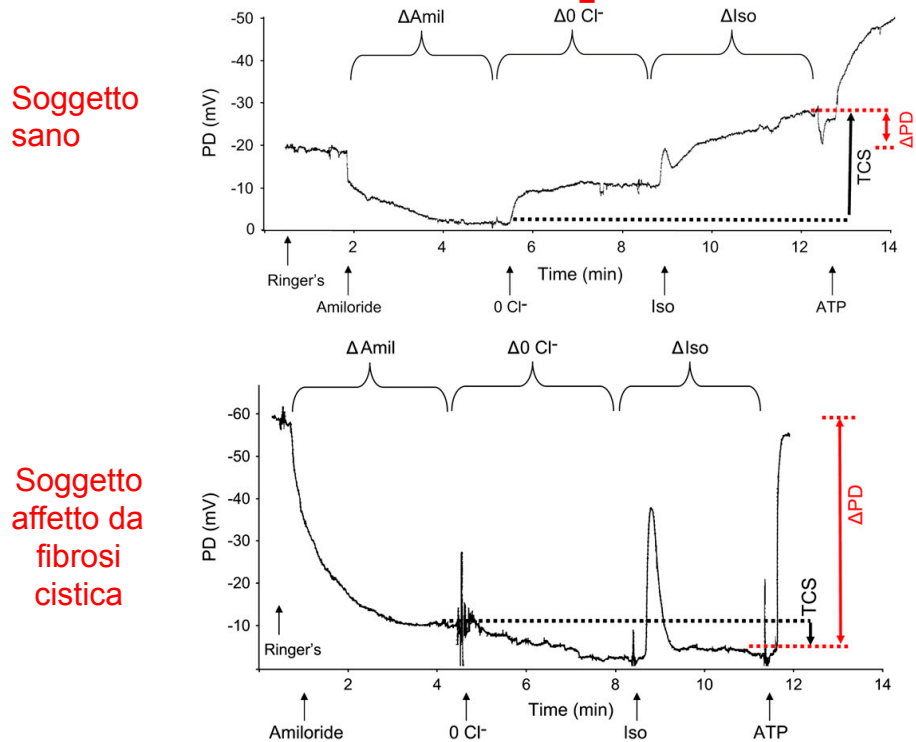
1

Queste note riportano i contenuti essenziali del Meeting sui Farmaci Correttori e Potenzianti nella Fibrosi Cistica, che si è tenuto a Firenze presso l'Ospedale Pediatrico A. Meyer il 26 maggio 2012, ed alcuni spunti del Congresso Europeo sulla Fibrosi Cistica, che si è tenuto a Dublino dal 6 al 9 giugno 2012. Farò periodicamente degli aggiornamenti di queste informazioni, che troverete nel sito del Centro. Resto a disposizione per rispondere a dubbi e richieste all'indirizzo e-mail centro.fc@meyer.it.

Vi auguro una buona estate!

Dr. Cesare Braggion

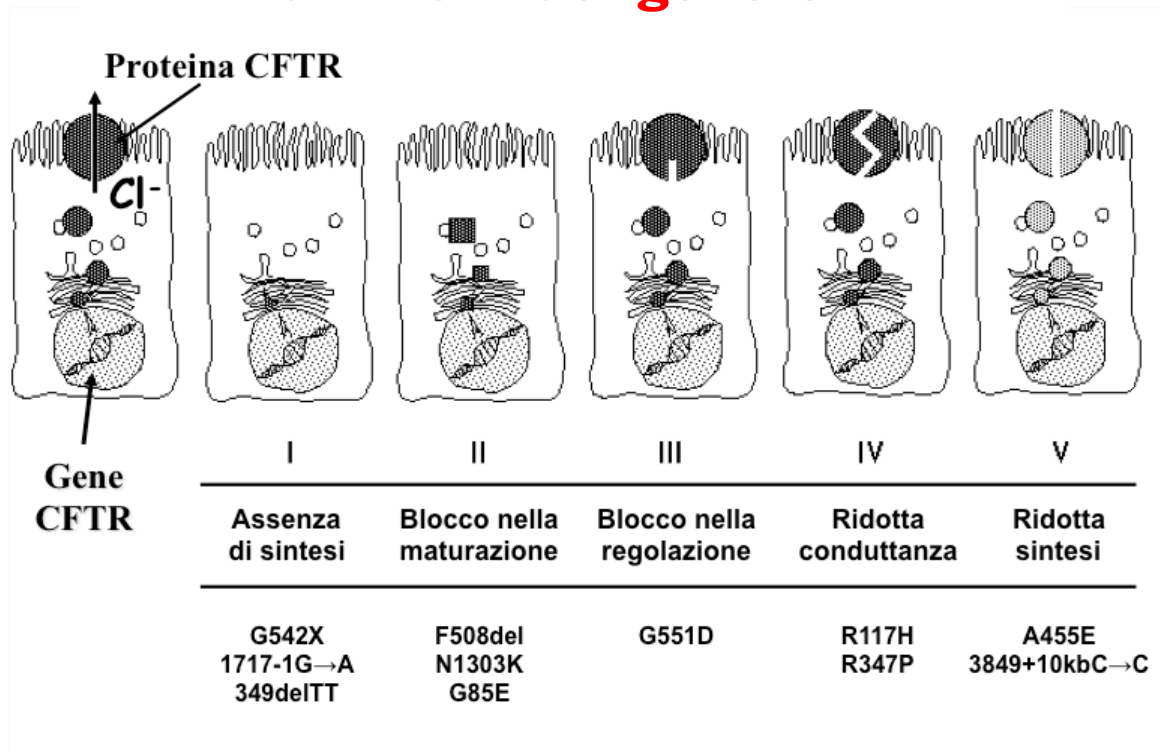
Misura della differenza di potenziale nasale



Si parlerà spesso in queste note della **misura della differenza di potenziale elettrico della mucosa nasale (NPD)**. Consiste nel misurare la corrente elettrica e le sue variazioni al variare del trasporto di cloro e sodio attraverso le cellule della mucosa nasale. In condizioni basali (perfusione della mucosa nasale con soluzione di Ringer) NPD ha nella fibrosi cistica un valore più negativo rispetto al soggetto normale (-60 rispetto a -20 millivolt)(vedi figura): questa differenza è da attribuire al difetto di secrezione del cloro e all'aumentato assorbimento di sodio. La misura di NPD consente di valutare, perfondendo l'epitelio nasale con farmaci o soluzioni diverse, sia il trasporto di sodio che quello di cloro.

La perfusione con un inibitore del canale del sodio, l'amiloride, produce nella fibrosi cistica una riduzione dell'**assorbimento del sodio**: NPD diventa più positivo passando da -60 a -10 mV; nel soggetto normale la variazione di NPD è minore e va da -20 a circa 0 mV. La **secrezione del cloro**, dipendente dalla proteina CFTR, si valuta perfondendo la mucosa nasale con una soluzione priva di cloro (0 Cl⁻ nella figura) e successivamente con un farmaco che stimola il canale, l'isoproterenolo (Iso nella figura): nel soggetto con fibrosi cistica il canale del cloro non funziona e con la prima e la seconda perfusione NPD non si modifica, restando a valori di circa 0; nel soggetto sano il trasporto di cloro è normale e NPD diventa più negativo, passando da 0 a -10 e con l'isoproterenolo da circa -10 a -25 mV.

Mutazioni del gene CFTR



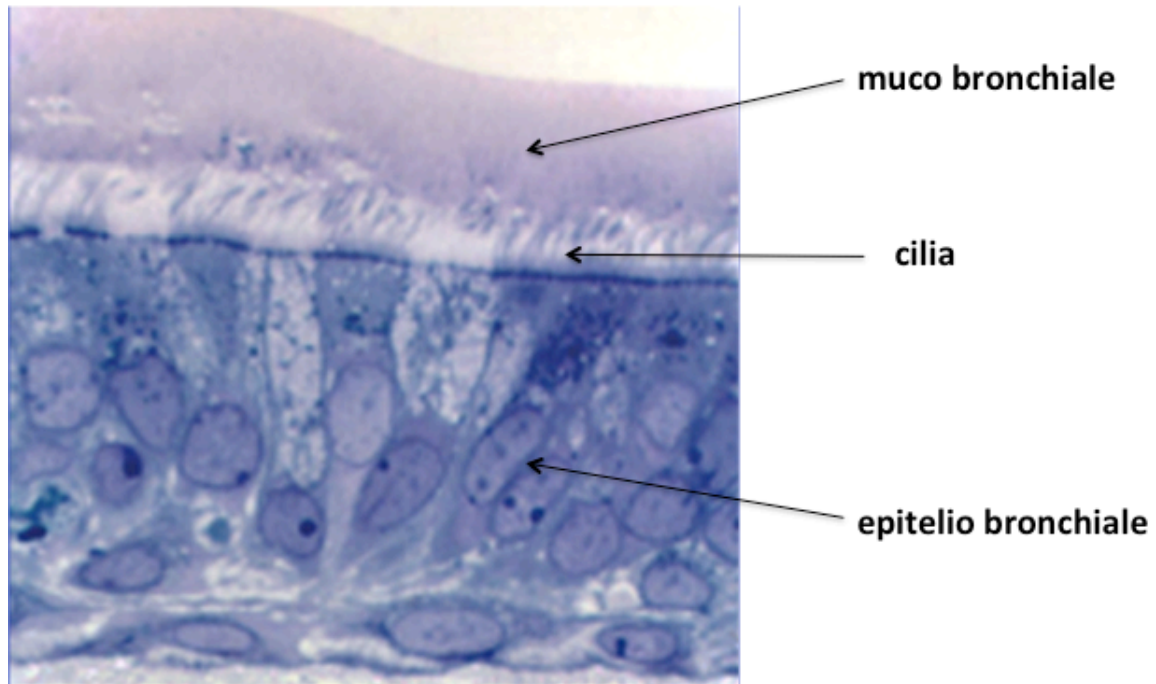
Cystic Fibrosis Mutation Data Base: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>

La Figura riporta la **classificazione delle mutazioni** della fibrosi cistica, cioè come queste interferiscono con la proteina CFTR. Sulla sinistra è riportata una cellula normale: il gene CFTR normale produce una proteina CFTR che si posiziona sulla membrana apicale, dove funziona come un canale del cloro (svolge anche un'azione sul canale del sodio, che non è rappresentato nella figura). Nel caso delle mutazioni di classe I e II non vi è proteina CFTR sulla membrana cellulare, o perchè la proteina non viene sintetizzata (classe I) o perchè è mal ripiegata e viene eliminata nel reticolo endoplasmatico, non arrivando alla membrana cellulare. Nel caso delle mutazioni di classe III, IV e V una quota di proteina CFTR arriva alla membrana apicale delle cellule, dove è peraltro poco funzionante: a queste tre classi di mutazioni si associa sufficienza pancreatica.

Un filone della ricerca ha come scopo quello di correggere con farmaci lo specifico difetto che caratterizza una determinata classe di mutazioni (**modulatori della proteina CFTR**). Alla base c'è uno screening ad alta efficienza (high-throughput screening) che saggia una vasta libreria di farmaci su cellule per uno specifico difetto della proteina CFTR. I farmaci più promettenti vengono caratterizzati e perfezionati per l'uso nell'uomo e studiati in vitro e/o nell'animale di laboratorio per la loro efficacia; se efficaci e sicuri segue la verifica in ricerche di fase II e III nel soggetto ammalato.

I modulatori della proteina CFTR sono distinti in "**potenziatori**" come l'ivacaftor (Kalydeco®), che agisce direttamente sulla proteina CFTR, presente sulla superficie cellulare, e "**correttori**", che agiscono, nel caso delle mutazioni di classe II, favorendo la maturazione in modo che la proteina esca dal reticolo endoplasmatico e arrivi alla membrana cellulare.

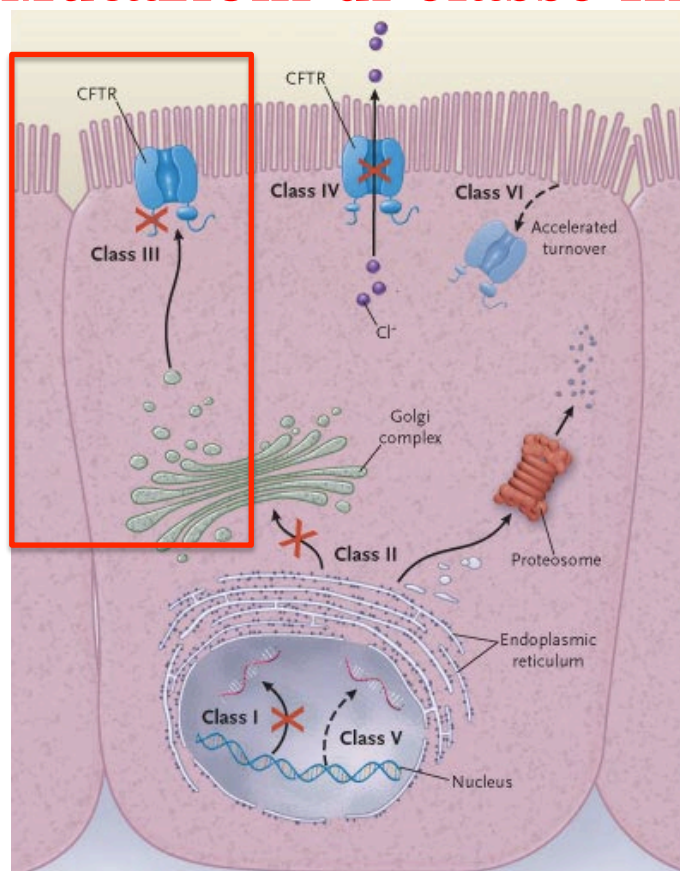
Clearance muco-ciliare



Uno dei meccanismi di difesa dell'organismo è rappresentato dalla cosiddetta **clearance (spostamento) del muco bronchiale**. Le cellule che rivestono i bronchi sono dotate di cilia che si muovono ritmicamente in una sola direzione (verso la bocca) per spostare il muco, che è depositato sulla loro superficie. Il movimento ciliare è efficiente se le cilia sono integre e se sono immerse in un liquido, detto liquido periciliare. Il muco è prodotto da alcune cellule dell'epitelio bronchiale e dalla ghiandole mucose della parete bronchiale. Gli agenti estranei ed i batteri contenuti nell'aria si depositano sulla superficie del muco, che viene allontanato dal battito ciliare. Questo movimento del muco verso la bocca è continuo. Una normale clearance muco-ciliare è pertanto una "barriera" contro le infezioni.

Alla base della **malattia polmonare** della **fibrosi cistica** vi è, a livello delle cellule bronchiali, una ridotta secrezione di cloro ed un aumentato riassorbimento del sodio, che dipendono dal difetto della proteina CFTR. L'alterazione dello scambio di cloro e sodio comporta una riduzione del liquido periciliare: le cilia si muovono in modo inefficiente o non si muovono ed il muco non viene allontanato. A ciò contribuisce anche una maggiore viscosità e l'abbondanza del muco bronchiale. I germi non vengono allontanati e possono rimanere stabilmente nei bronchi, trovando un ambiente favorevole (ristagno di muco con scarsa ossigenazione nel suo strato più profondo). I globuli bianchi (neutrofili) non riescono ad allontanare i batteri e persistono nelle vie aeree (infiammazione). Le sostanze lesive prodotte dai batteri e dai globuli bianchi si accumulano ed alterano la struttura della parete bronchiale (bronchiectasie). Persiste un circolo vizioso infezione-infiammazione, con l'automantenimento dei due fenomeni.

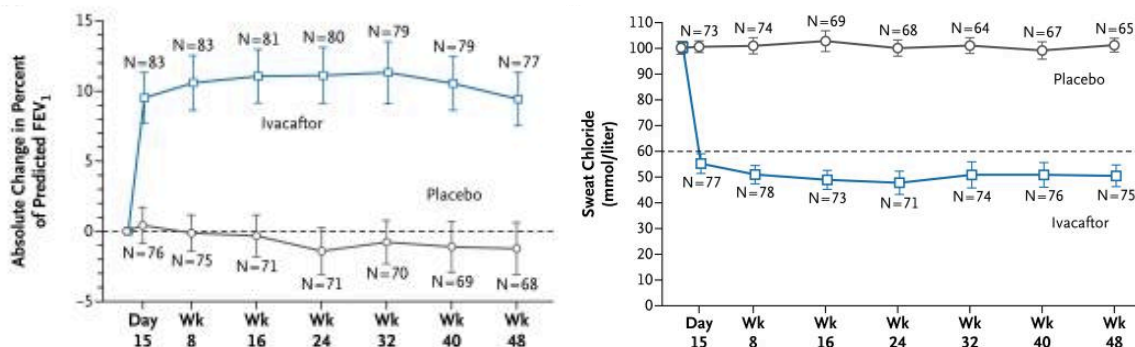
Mutazioni di classe III



Le **mutazioni di classe III** sono caratterizzate dalla sintesi e dal trasferimento della proteina CFTR alla membrana cellulare (vedi la figura). A questo livello però, la proteina ha un difetto di apertura ("gating") del canale ed il cloro perciò non passa all'esterno della cellula. Le mutazioni di classe III (ad es. G551D, G178R, S549R, S549N, S125N) rappresentano circa il 5% delle mutazioni negli USA e UK. La loro frequenza è inferiore allo 0.5% in Italia e pari a circa il 2% in Francia e Germania.

Gli **studi in vitro** su cellule bronchiali umane con la mutazione G551D hanno dimostrato che il **potenziatore VX-770 (ivacaftor)** aumentava la secrezione del cloro a circa il 50% rispetto alle cellule normali, dimostrandosi circa 70 volte più potente della genisteina. Ivacaftor è stato utilizzato anche sulle cellule bronchiali umane con due alleli mutati per la mutazione F508del: il trasporto di cloro, senza intervento di un correttore o dell'abbassamento della temperatura, aumentava del 16% rispetto alle cellule normali. E' noto che il difetto della proteina CFTR influenza anche il canale del sodio (ENAC) con un aumento del riassorbimento di sodio: gli studi in vitro hanno dimostrato che VX-770 non aveva effetto diretto sul canale del sodio ma, agendo su CFTR riduceva il riassorbimento di Na. Gli studi in vitro hanno inoltre dimostrato che la somministrazione di VX-770 aumentava, attraverso il potenziamento del trasporto di cloro e l'inibizione del canale del sodio, il volume di liquido periciliare sulla superficie delle cellule con la mutazione G551D di circa il 50%, normalizzando il battito ciliare (*PNAS 2009; 106(44):18825*). Con queste premesse sperimentali si è passati a valutare l'efficacia e la sicurezza di VX-770 in soggetti con FC e la mutazione G551D e seppur con un effetto dimostrato minore in soggetti omozigoti per la mutazione F508del (vedi oltre).

Efficacia del potenziatore VX-770 (ivacaftor) Studio di fase III in soggetti con mutazione G551D

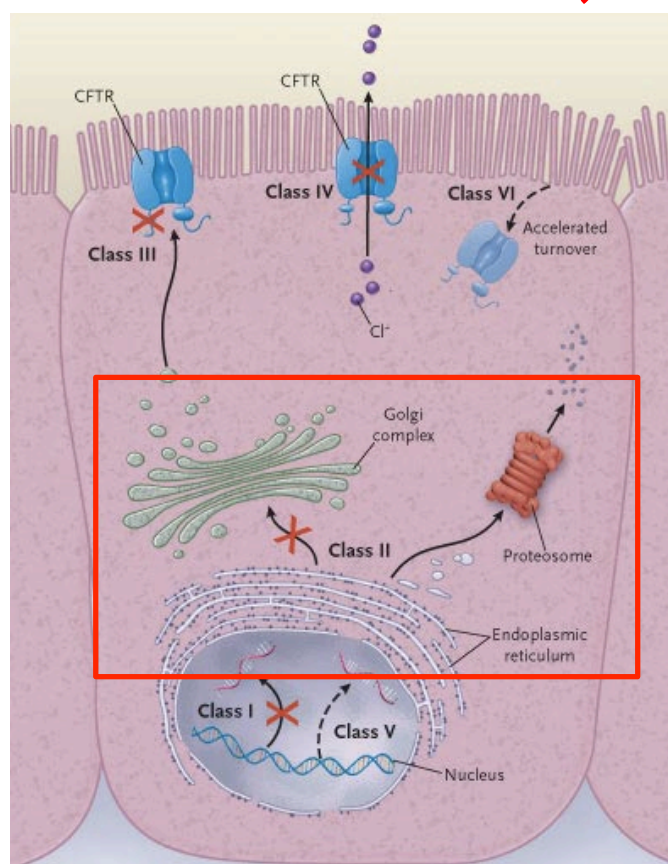


Un primo **studio di fase II** di 2-4 settimane in 39 pazienti per identificare la dose efficace e sicura di VX-770 (**ivacaftor o Kalydeco®**) ha mostrato buoni effetti, confermati nello studio di fase III successivo. La secrezione di cloro, valutata con NPD, migliorava significativamente rispetto ai valori basali (in media -5.4 mV) ma non rispetto al placebo; i responders (NPD più negativo di almeno 5 mV) erano il 62% dei pazienti (*N Engl J Med* 2010; 363:1991).

Recentemente è stato condotto a termine uno **studio di fase III**, che ha valutato l'efficacia e la sicurezza del farmaco (150 mg per bocca due volte al dì), somministrato per 1 anno, rispetto al placebo in circa 160 paziente, nei quali una delle due mutazioni era la **G551D** (*N Engl J Med* 2011; 365: 1663). La figura mostra a sinistra l'aumento di un parametro della spirometria, il **FEV1** (volume espiratorio forzato al primo secondo): l'aumento era del 10.5% predetto (ad es. in un maschio di 17 anni il FEV1 pari a 2.24 L, che corrisponde al 60% predetto, aumentava a 2.63 L, che corrispondeva al 70.5% predetto). La figura mostra sulla destra la variazione del **cloro nel sudore**: il suo valore pari a circa 100 mmol/L si riduceva ad un valore di circa 50 mmol/l. Entrambi questi risultati, stabili per la durata dello studio, e gli altri riportati (riduzione del 55% del rischio di esacerbazione polmonare) sono evidenti e rilevanti dal punto di vista clinico.

Sono in corso di organizzazione studi clinici di fase III, che valuteranno l'efficacia e la sicurezza dell'ivacaftor nei soggetti con le altre **mutazioni di classe III** (ad es. R117H, G178R e S549N) e con alcune mutazioni di **altre classi** (ad es. A455E, P67L, D1152H, S1235R). Gli studi in vitro su cellule di topo o umane hanno infatti dimostrato che ivacaftor aveva un effetto di potenziamento della secrezione di cloro nel caso di altre mutazioni di classe III e per alcune mutazioni di altra classe, per le quali era dimostrato in condizioni basali almeno un minimo trasporto di cloro (1-3% rispetto al normale).

La mutazione di classe II, F508del



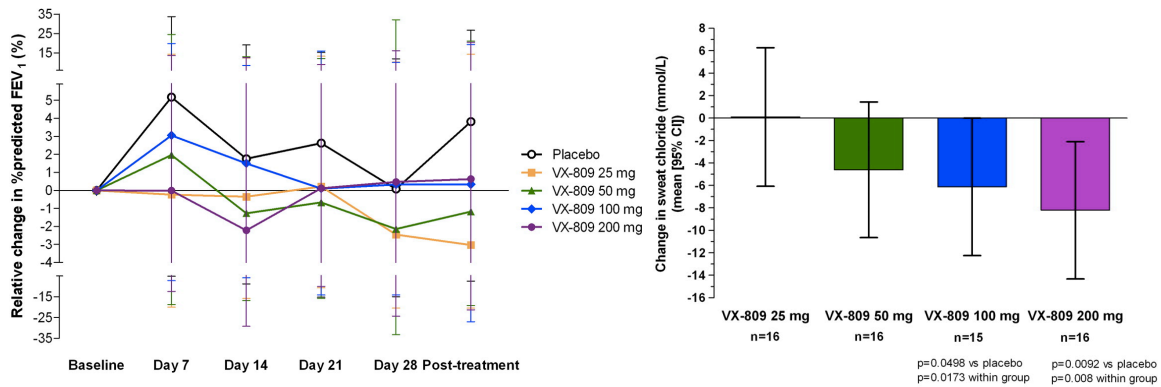
La mutazione **F508del** (denominata anche "**deltaF508**" o "**ΔF508**") è la **più frequente mutazione** nei soggetti con fibrosi cistica. Mentre negli USA e Nord Europa rappresenta circa l'80-90% delle mutazioni, nelle regioni centrali e meridionali dell'Italia rappresenta circa il 40-50% delle mutazioni.

La figura mostra che il **difetto** per questa mutazione è **duplice**: la proteina CFTR esce dal nucleo e arriva nella zona di "assemblaggio", il reticolo endoplasmatico, ma poiché la sua conformazione è anomala, viene eliminata dal sistema di "demolizione" cellulare (proteosoma). Solo una piccolissima quantità di proteina CFTR arriva perciò alla superficie cellulare e lì ha un difetto di apertura ("gating") per la fuoriuscita del cloro. C'è bisogno di un **correttore** per far maturare la proteina e farla uscire dal reticolo endoplasmatico e di un **potenziatore** per attivarne l'apertura.

Gli **studi in vitro** su cellule di soggetti omozigoti per la mutazione F508del hanno dimostrato che: a) il **correttore VX-809** migliorava la conformazione ("folding") di una parte della proteina CFTR, permettendogli di arrivare alla membrana cellulare; b) VX-809 non funzionava anche come "potenziatore" della proteina CFTR arrivata sulla membrana cellulare, mentre funzionava sull'apertura del canale del cloro il potenziatore VX-770; c) il trasporto/secrezione del cloro aumentava a circa il 15% rispetto al normale con VX-809 ed a circa il 25% del normale con la combinazione VX-809 + VX-770 (= **correttore + potenziatore**); d) l'effetto additivo di VX-809 e VX-770 era evidente anche per l'incremento dello spessore del liquido periciliare sulla superficie delle cellule (incremento del 50%); e) la combinazione di correttori diversi, che agiscono con meccanismi diversi, potrebbe avere un effetto additivo sul trasporto del cloro (*PNAS 2011; 108 (46):18843*).

Efficacia del correttore VX-809

Studio di fase IIa in soggetti omozigoti per la mutazione F508del

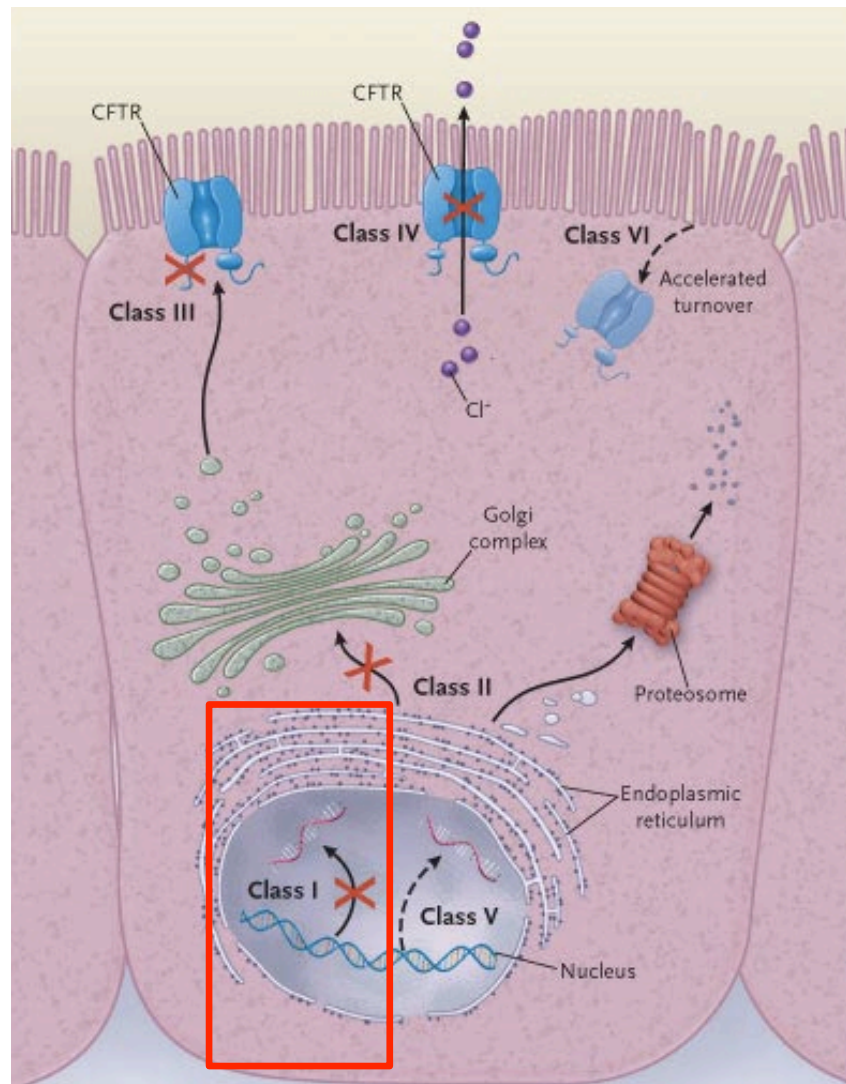


Uno **studio clinico di fase IIa** ha mostrato che la monosomministrazione di 200 mg di **VX-809** era efficace e sicura in **soggetti omozigoti per la mutazione F508del**. La figura mostra peraltro a sx che non vi era effetto di questa dose sulla spirometria (FEV₁) in confronto al placebo ed, a dx, un modesto effetto alla dose maggiore sul cloro contenuto nel sudore (riduzione di circa 8 mmol/L)(si confrontino i risultati ottenuti con il VX-770)(*Thorax 2012; 67:12*).

Due **studi clinici di fase II** hanno considerato **soggetti omozigoti per la mutazione F508del**: a) il **potenziatore ivacaftor** non è efficace sulla spirometria (FEV₁) e non modifica il cloro nel sudore (*Chest 2012; Mar 1, Epub*); b) è in corso uno studio clinico che valuta l'effetto della **combinazione VX-809 + ivacaftor**: non si conoscono i risultati definitivi.

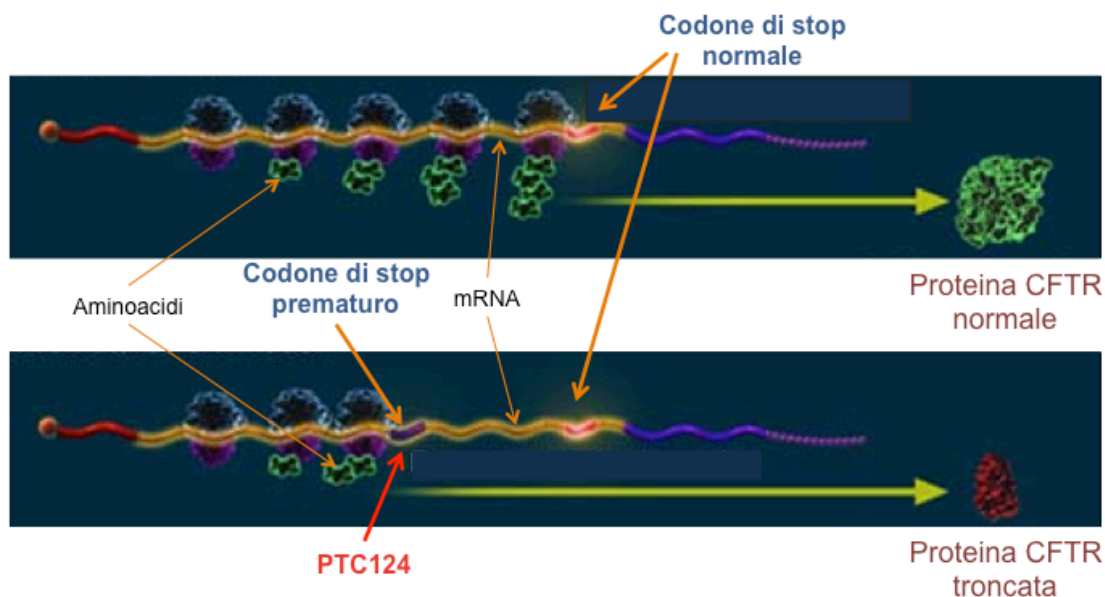
Questi studi dimostrano che è più difficile e complesso correggere i due difetti, di cui è responsabile la mutazione F508del. La ricerca sta valutando: a) correttori diversi (es. VX-661); b) dosi maggiori di VX-809; c) la combinazione di almeno 2 correttori ed un potenziatore; d) come interferire sui meccanismi di demolizione della proteina CFTR malconformata e perciò sul proteosoma, per consentire ad una quota maggiore di proteina di arrivare sulla superficie cellulare.

Le mutazioni di classe I



Le **mutazioni di classe I** rappresentano circa il 10% delle mutazioni; in Italia la loro frequenza è circa doppia. Comprendono ad esempio la G542X, W1282X, R1162X e 1717-1G>A. Questo gruppo di mutazioni (vedi figura) è caratterizzato dall'interruzione molto precoce del processo di sintesi della proteina: a livello del nucleo cellulare ne risulta una proteina troncata, che non procede negli organelli cellulari al di fuori del nucleo, come avviene per tutte le altre classi di mutazioni, e viene rapidamente degradata (vedi oltre).

Mutazioni di classe I

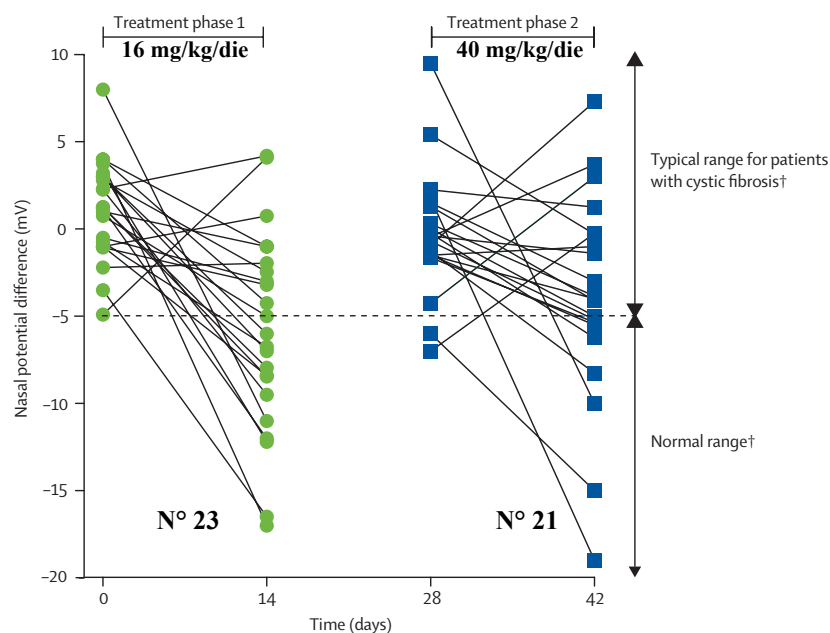


A livello del nucleo cellulare le informazioni contenute nel DNA vengono copiate nell'RNA messaggero (mRNA). Questo filamento contiene delle informazioni a cui vengono appaiati specifici aminoacidi; un insieme di aminoacidi costituisce una proteina. Nella figura in alto si vede che il montaggio di aminoacidi procede fino ad una informazione di stop (**codone di stop**): si produce una proteina CFTR normale. Nella figura in basso si vede che nel filamento dell'mRNA c'è una informazione di stop prematura (**codone di stop prematuro**). Si forma così una proteina troncata, che viene rapidamente eliminata. **L'antibiotico gentamicina** della classe degli aminoglicosidi ed un farmaco come il **PTC124** hanno dimostrato in vitro di poter far procedere la sintesi della proteina oltre il codone di stop prematuro.

Gli **studi nel modello animale** (topo transgenico con la mutazione G542X) hanno dimostrato che la somministrazione sia sottocute che orale di **PTC124** si associava all'espressione della proteina CFTR sulla superficie dell'epitelio delle ghiandole sottomucose intestinali (microscopia a fluorescenza), come avveniva somministrando l'antibiotico gentamicina. La somministrazione sottocutanea ed orale di PTC124 aumentava la secrezione di cloro nella mucosa intestinale del 30% rispetto al topo normale (studio di NPD): ciò avveniva però in circa il 50% dei preparati, allo stesso modo della somministrazione di gentamicina. Rispetto alla gentamicina o altri antibiotici aminoglicosidi il PTC124 ha un profilo di sicurezza migliore e con queste premesse si è passati alla sperimentazione nel soggetto affetto (*PNAS 2008; 105(6):2064*)

Efficacia di PTC124 nelle mutazioni di classe I

Studio di fase II in pazienti con almeno 1 mutazione di classe I



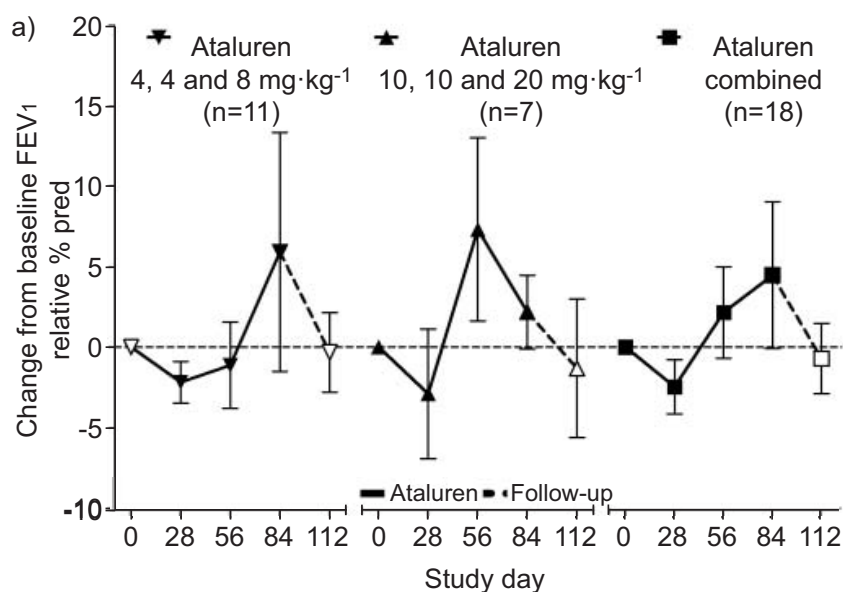
Uno studio di fase II, condotto da un gruppo israeliano, ha valutato l'efficacia di **PTC124 (ataluren)** in 23 adulti con fibrosi cistica, considerando come criterio di efficacia un aumento del trasporto del cloro, misurato come una NPD che diventava più negativo di 5 millivolts (mV). Sono state considerate **due dosi** di ataluren, 16 e 40 mg/kg/die, ciascuna somministrata per bocca in tre somministrazioni quotidiane per 2 settimane.

La figura mostra i risultati dell'effetto della dose inferiore a sx e della dose maggiore di farmaco a dx, rispettivamente in 23 e 21 pazienti su NPD, misurata all'inizio e alla fine del ciclo di terapia. Considerando la secrezione di cloro (perfusione priva di cloro + isoproterenolo) si osserva una tendenza alla riduzione di NPD con entrambe le dosi di farmaco (in media -7.1 e -3.7 mV) rispetto ai valori basali (non vi è confronto con il placebo): ciò corrispondeva ad un **aumento del trasporto di cloro** nelle cellule della mucosa nasale. L'aumento del trasporto del cloro era definito **"significativo"** dagli autori, se NPD diventava più negativa di almeno 5 mV (-5 mV): ciò avveniva in 16 su 23 pazienti (70%) alla dose inferiore (a sx) ed in 8 su 21 pazienti (38%) alla dose maggiore (a dx). La figura mostra anche che si otteneva una **normalizzazione del trasporto del cloro** se NPD diventava inferiore a -5 mV (più negativo): ciò avveniva in 13 su 23 pazienti (57%) con la dose inferiore e 9 su 21 pazienti (43%) con la dose maggiore.

La spirometria aumentava di poco (non specificato) ed il cloro nel sudore non si modificava. Il farmaco si è dimostrato sicuro (*Lancet 2008; 372:719*). Quindi, circa la **metà dei pazienti era responsiva alla terapia** e ciò non dipendeva dalla dose del farmaco, nè dal tipo di mutazione.

Efficacia di PTC124 nelle mutazioni di classe I

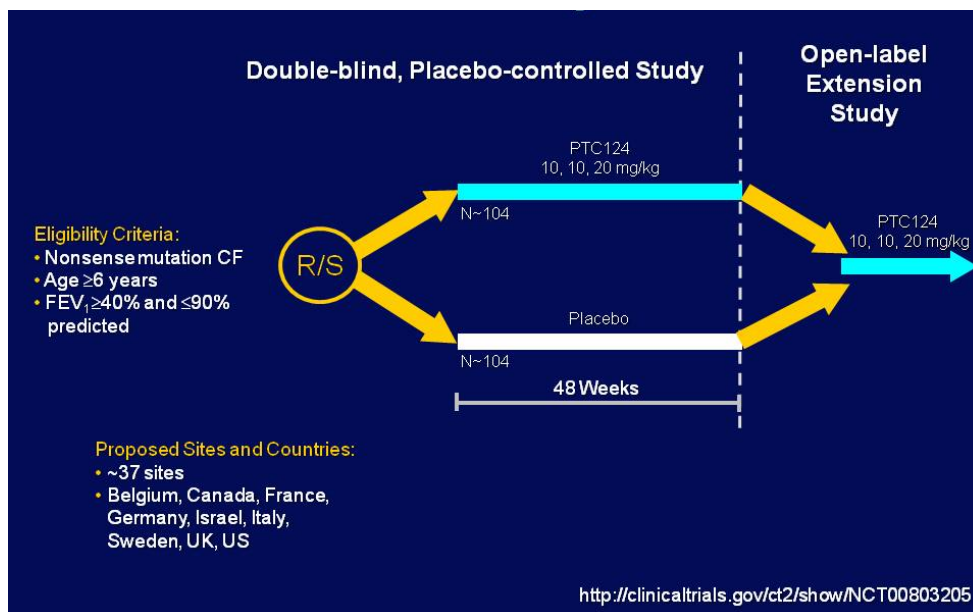
Estensione dello studio di fase II con somministrazione per 3 mesi



Gli **stessi risultati dello studio precedente** sono stati ottenuti con la misura di NPD in **bambini di età tra i 6 ed i 18 anni** con almeno una mutazione di classe I. In particolare, circa la metà dei bambini erano "responders", cioè avevano una variazione del potenziale elettrico di almeno 5 mV e questo diventava più negativo rispetto alla soglia di -5 mV; inoltre questo effetto era indipendente dalla dose di farmaco e dal tipo di mutazione e non si accompagnava a variazione della spirometria dopo 2 settimane di terapia con PTC124 (*Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182:1262).

Gli autori dello **studio israeliano di fase II** hanno valutato una **estensione** dello studio agli stessi pazienti, **prolungando la somministrazione di ataluren a 3 mesi**. Ogni paziente continuava la dose di farmaco che aveva dato la maggior risposta con la misura di NPD: il numero dei soggetti studiati è modesto, trattandosi di 12 pazienti con la dose inferiore (16 mg/kg/die) e 7 pazienti con la dose maggiore (40 mg/kg/die). I risultati di questo studio sono i seguenti: a) il **trasporto del cloro**, valutato con la misura di NPD, aumentava con l'aumento della durata dello studio, arrivando ad un **massimo dopo 3 mesi** di avvio della terapia; b) considerando entrambe le dosi di farmaco, i **"responders"** (variazione di NPD dopo perfusione di soluzione priva di cloro e con isoproterenolo a valori più negativi rispetto a -5 mV) erano il **61%**; c) il **FEV1**, parametro della spirometria, aveva un **incremento modesto e non significativo**: considerando i dati per entrambe le dosi di farmaco (vedi la figura a destra), vi era un aumento del 4.5% rispetto al valore predetto (ad es. in un maschio di 17 anni con FEV1 pari a 2.24 L, che corrisponde al 60% predetto, il parametro aumentava al 62.7% predetto, che corrispondeva a 2.34 L); d) il **numero di colpi di tosse si riduceva** di circa il **20%**.

Efficacia di PTC124 nelle mutazioni di classe I Studio clinico di fase III (1 + 1 anno)

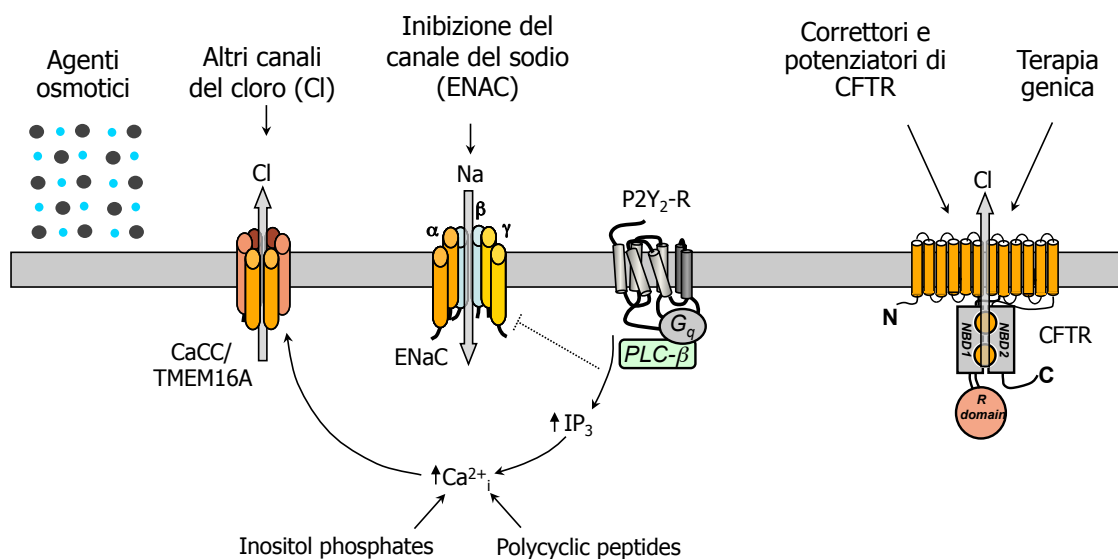


I dati di efficacia riportati negli studi di fase II con il PTC124 (ataluren) ed il positivo profilo di sicurezza del farmaco hanno portato all'organizzazione di uno **studio clinico di fase III, multicentrico e multinazionale**. Questo trial clinico (vedi figura) prevedeva due bracci, ciascuno di circa 100 pazienti (inclusione: età > 6 anni, FEV₁ > 40% pred. e < 90% pred., almeno una mutazione di classe I): un gruppo di pazienti assumeva l'ataluren alla dose di 40 mg/kg/die, l'altro gruppo assumeva il placebo per 1 anno. L'efficacia del farmaco era valutata considerando le variazioni nella spirometria (FEV₁). L'assegnazione di ogni paziente all'uno o l'altro braccio era casuale (randomizzazione). Trascorso l'anno di terapia in doppio cieco (né i pazienti, né i ricercatori erano a conoscenza se il singolo paziente assumeva il farmaco o il placebo), seguiva uno studio in aperto con tutti i pazienti che assumevano per un'altro anno solo l'ataluren.

Lo studio è stato completato ed è in corso di valutazione. **Alcuni risultati** sono stati riportati **al congresso europeo di Dublino**: l'aumento del FEV₁ era modesto e di circa il 3% rispetto al valore predetto (ad es. in un maschio di 17 anni con FEV₁ pari a 2.24 L, che corrisponde al 60% predetto, il parametro aumentava al 61.8% predetto, che corrispondeva a 2.30 L). L'aumento di FEV₁ era superiore e significativo nel sottogruppo di pazienti che non facevano antibiotici per via inalatoria: l'interpretazione di questo risultato è dubbia. Una valutazione più precisa e puntuale dei risultati sarà possibile quando i risultati saranno pubblicati.

Farmaci attivi sulla clearance muco-ciliare

Effetto sullo scambio di ioni e/o liquido peri-ciliare



Adapted from Thelin & Boucher, 2007

Alternative Approaches for Restoring Mucociliary Clearance in CF, Florence 2012, Derek Paisley

Si possono considerare i **nuovi farmaci** rispetto al meccanismo con cui migliorano la clearance muco-ciliare. Alcuni farmaci osmotici agiscono richiamando acqua per aumentare il liquido periciliare: si tratta della soluzione salina al 7% e della polvere di mannitolo. Si potrebbero attivare con farmaci anche i canali alternativi del cloro, quelli attivati dal calcio (Ca): il gruppo di ricercatori di Genova (Prof. Galletta) ha contribuito ad identificare il canale TMEM16A, che si comporta come un canale del cloro, calcio-dipendente. Dopo le esperienze negative con l'amiloride, il Moli 1901, il denufosol, alcuni gruppi stanno studiando farmaci che bloccano il canale del sodio (ENaC): questi farmaci devono avere una lunga durata d'azione e devono non determinare un aumento del potassio cellulare.

Nelle note precedenti abbiamo visto come i correttori ed i potenziatori del canale CFTR del cloro modifichino la funzione di canale, il liquido periciliare e la clearance mucociliare in dipendenza dalla classe di mutazione e con risultati diversi. Benchè a tutt'oggi la terapia genica non abbia dato prova di efficacia e completa sicurezza, resta un filone di ricerca attivo. Iniziali sono gli studi sulla terapia cellulare, cioè l'uso di cellule staminali, per una terapia antiinfiammatoria o come candidate alla terapia genica per poi essere indirizzate al polmone.

La **ricerca** procede perciò a 360° gradi per i nuovi farmaci ed anche per confermare efficacia e sicurezza delle terapie tradizionali. Il filone della terapia mutazione-specifica ha dato primi risultati promettenti, ma sembra che per le mutazioni di classe I e II vi sia necessità di testare nuovi farmaci, una loro combinazione e la loro associazione con un potenziatore. Gli studi mostrano anche che vi è una scarsa correlazione tra misura di NPD e la variazione della spirometria o di altre misure di esito clinico, mentre a queste ultime sembra meglio correlare la variazione di cloro sudorale.