

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

TERAPIE INNOVATIVE NEL TRATTAMENTO
DELL'ATEROSCLEROSI E DELL'IPERCOLESTEROLEMIA

RELATORE: Chiar.ma Prof.ssa Mammucari Cristina

LAUREANDA: Flamigni Ludovica

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare la mia relatrice, la Prof.ssa Cristina Mammucari, per il supporto fornito alla stesura di questa tesi e la sua disponibilità ed organizzazione sempre presenti nel momento del bisogno.

Ringrazio la mia famiglia per avermi sempre sostenuto e per essere stati per me un modello di resilienza, amore e duro lavoro a cui guardare sempre con orgoglio.

INDICE

INTRODUZIONE.....	1
1. LE DISLIPIDEMIE	3
1.1. Le lipoproteine	4
1.2. Metabolismo lipidico	7
2. L'ATEROSCLEROSI	9
2.1. Patogenesi	9
2.1.1. Lesione iniziale.....	9
2.1.2. Stria lipidica	11
2.1.3. Cappuccio Fibroso.....	13
2.1.4. Placca complessa.....	13
2.1.5. Rottura della placca ateromatosa.....	14
2.2. Outcomes cardiovascolari	15
2.2.1. Trombo	15
2.2.2. Embolo	16
2.2.3. Aneurisma.....	16
2.2.4. Stenosi	16
2.3. Fattori di rischio	17
2.3.1. Ipercolesterolemia	18
2.3.2. Ipercolesterolemia familiare.....	19
2.4. Approcci terapeutici	20
3. TERAPIE STANDARD	21
3.1. Statine	21
3.1.1. Meccanismo d'azione.....	22
3.1.2. Farmacocinetica.....	24
3.1.3. Effetti avversi	27
3.1.4. Terapia	27
3.2. Ezetimibe	29
3.2.1. Meccanismo d'azione.....	30
3.2.2. Farmacocinetica.....	32
3.2.3. Effetti avversi	33
3.2.4. Terapia	33
3.3. Sequestranti degli acidi biliari.....	36

3.3.1. Meccanismo d'azione	37
3.3.2. Farmacocinetica	40
3.3.3. Effetti Avversi	40
3.3.4. Terapia.....	41
3.4. Plasmaferesi extracorporea	45
3.4.1. Tecniche di aferesi lipoproteica	45
3.4.2. Campo di applicazione dell'aferesi lipoproteica	46
3.4.3. Trattamento	47
4. TERAPIE INNOVATIVE	51
4.1. Inibitori di PCSK9	51
4.1.1. Funzione, struttura e biosintesi di PCSK9	51
4.1.2. Anticorpi monoclonali inibitori di PCSK9	54
4.1.2.1. Alirocumab ed Evolocumab	55
4.1.2.2. Effetti avversi	56
4.1.2.3. Terapia	58
4.1.3. Small interfering RNA contro la traduzione dell'mRNA codificante per PCSK9	62
4.1.3.1. Inclisiran	67
4.1.3.2. Effetti avversi	70
4.1.3.3. Terapia	71
4.2. Acido Bempedoico	74
4.2.1. Meccanismo d'azione	75
4.2.2. Farmacocinetica.....	78
4.2.3. Effetti avversi.....	80
4.3. Inibitori di ANGPTL3.....	84
4.3.1. Funzione e struttura di ANGPTL3.....	85
4.3.2. mAb inibitori di ANGPTL3.....	88
4.3.2.1. Meccanismo d'azione.....	89
4.3.2.2. Farmacocinetica.....	90
4.3.2.3. Terapia	91
4.4. Lomitapide	92
4.4.1. Meccanismo d'azione	93
4.4.2. Farmacocinetica	94
4.4.3. Effetti avversi.....	95
4.4.4. Terapia.....	95
4.5. Volanesorsen	100
4.5.1. Meccanismo d'azione	103
4.5.2. Farmacocinetica.....	105

4.5.3. Effetti Avversi.....	106
4.5.4. Terapia	107
<i>CONCLUSIONI</i>	109

INTRODUZIONE

L'aterosclerosi è una condizione patologica estremamente diffusa nel mondo occidentale ed è il principale fattore di rischio per l'incidenza di eventi cardiovascolari, che costituiscono la prima causa di morte nel mondo.

Questo elaborato si concentra sulle terapie ipocolesterolemizzanti riconoscendo il ruolo fondamentale del colesterolo e di eventuali squilibri a carico del suo metabolismo nell'insorgenza della stria lipidica fino alla formazione della placca ateromatosa.

L'obiettivo dell'elaborato è di descrivere le principali terapie farmacologiche (oltre alla plasmafèresi extracorporea) attualmente approvate in commercio dall'EMA per il trattamento dell'ipercolesterolemia, fornendo una panoramica delle armi consolidate e innovative ad oggi disponibili per il trattamento non chirurgico o adiuvante la chirurgia dell'aterosclerosi.

1. LE DISLIPIDEMIE

Le dislipidemie sono un insieme di patologie legate ad un alterato contenuto plasmatico di lipidi. In questo tipo di patologie è possibile riscontrare livelli elevati di determinate lipoproteine ovvero aggregati macromolecolari costituiti da lipidi e proteine. [1]

Data l'eterogeneità del termine, nel 1965 Frederickson ha provveduto a dividerle in 5 diverse classi sulla base della lipoproteina prevalente, senza tenere conto dei diversi geni coinvolti e nemmeno dell'HDL. La classificazione di Frederickson, successivamente adottata dalla World Health Organization, classifica esclusivamente le iperlipoproteinemie su base genetica, oggi annoverate come primarie.

Il fenotipo I si manifesta con valori elevati di chilomicroni.

Il fenotipo IIa presenta elevati livelli di LDL circolanti mentre il IIb ha valori elevati anche di VLDL.

Il fenotipo III ha valori elevati di IDL mentre il IV di VLDL. Il V si manifesta con valori elevati di VLDL e chilomicroni. [2]

FENOTIPO	LIPOPROTEINA AUMENTATA	COLESTEROLEMIA	TRIGLICERIDEMIA	ATEROGENICITÀ
I	Chilomicroni	Da normale a ↑	↑↑↑↑	Nessuna
IIa	LDL	↑↑	Normale	+++
IIb	LDL, VLDL	↑↑	↑↑	+++
III	IDL	↑↑	↑↑↑	+++
IV	VLDL	Da normale a ↑	↑↑	+/-
V	VLDL e chilomicroni	Da normale a ↑	↑↑↑↑	+/-

Tabella 1. Classificazione di Frederickson (Adattato da Yeshurun et al., 1995)

Al giorno d'oggi le dislipidemie vengono distinte principalmente tra primarie e secondarie. Le primarie trovano la loro causa in un'alterazione genetica, come l'ipercolesterolemia familiare. Le secondarie si manifestano nel corso della vita come conseguenza di uno stile di vita poco sano con abitudini alimentari errate e scarso esercizio fisico. [3]

La prima causa di morte nei paesi sviluppati è rappresentata dalle malattie cardiovascolari. Attualmente le dislipidemie sono una delle cause principali delle ASCVDs (Atherosclerotic Cardiovascular Diseases).

Tra queste l'ipercolesterolemia è la più frequente e va trattata in base al rischio cardiovascolare associato. [4]

1.1. Le lipoproteine

Le lipoproteine sono delle particelle essenziali nel nostro organismo in quanto consentono il trasporto dei lipidi ai diversi tessuti che non sarebbero in grado di raggiungere da soli a causa della loro natura lipofila.

Alterazioni alla sintesi delle lipoproteine o ai loro recettori possono portare a dislipidemie e conseguentemente all'insorgenza delle malattie cardiovascolari aterosclerotiche come la cardiopatia coronarica o l'ischemia cerebrovascolare. [4]

All'interno delle lipoproteine è possibile trovare una componente lipidica e una proteica, variabili in base alla tipologia di lipoproteina.

La porzione lipidica è costituita da colesterolo, sia libero che esterificato, fosfolipidi e trigliceridi. La porzione proteica invece vede la presenza di diversi tipi di proteine, definite apoproteine (o apolipoproteine), come l'ApoB-100 o l'ApoB-48. La loro presenza è necessaria per due motivi: il primo è strutturale, poichè le apoproteine conferiscono stabilità alla struttura della lipoproteina; il secondo motivo riguarda la funzionalità, dato che queste apoproteine sono necessarie per le interazioni della lipoproteina con i suoi recettori oppure con dei cofattori enzimatici essenziali per il metabolismo della lipoproteina stessa. [4], [5]

Dal punto di vista strutturale il *core* della lipoproteina è costituito dai lipidi ad elevata lipofilia, ovvero gli esteri del colesterolo e i trigliceridi. Il *core* è a sua volta rivestito dal resto dei costituenti più idrofili della lipoproteina, dunque colesterolo non esterificato, fosfolipidi e apoproteine. [4]

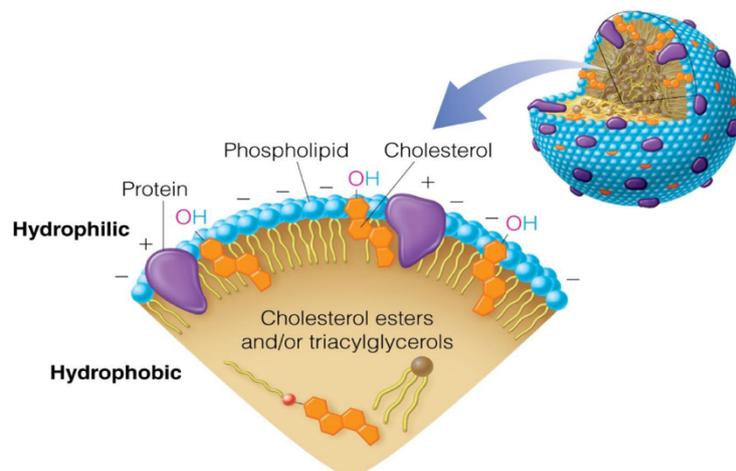


Figura 1. Struttura generica di una lipoproteina. [5]

Per separarle dal plasma si utilizza l'ultracentrifugazione che consente poi di distinguerle in lipoproteine a densità molto bassa (VLDL), bassa (LDL), intermedia (IDL) e alta (HDL). I diversi tipi di lipoproteine prendono il nome dalla loro densità, ad eccezione dei chilomicroni. [6], [7]

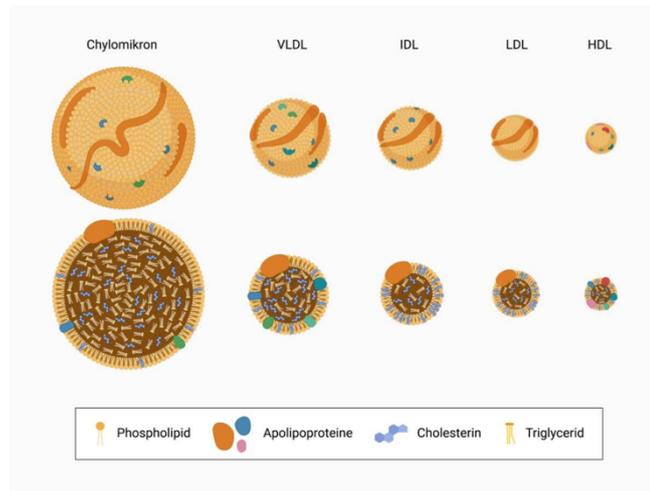


Figura 2. Diversi tipi di lipoproteine messi a confronto. [7]

I chilomicroni vengono sintetizzati nel reticolo plasmatico degli enterociti. Sono delle lipoproteine costituite dall'aggregazione dei trigliceridi introdotti con la dieta (80-95%) e dal colesterolo assorbito dall'intestino tenue (libero 1-3%, esterificato 2-4%). Tra tutte le lipoproteine, i chilomicroni sono quelli con dimensioni maggiori ma densità minore. Le apolipoproteine che contengono sono: apoA-I/A-II, apoB-48 e ApoC-I/C-II/C-III. [6] [1]

Il loro ruolo è quello di trasportare i trigliceridi assorbiti con la dieta al tessuto adiposo e al tessuto muscolare dove avviene l'idrolisi mediata dalla lipoproteina lipasi (LPL) con l'ApoC-II come cofattore. La LPL è un enzima situato sulla membrana delle cellule endoteliali dei capillari. [6]

Normalmente i chilomicroni sono presenti nel plasma di un paziente sano per 3-6 ore in seguito all'assunzione di un pasto.[4]

I chilomicroni remnant sono quello che resta in seguito all'idrolisi LPL mediata. Il loro contenuto in trigliceridi è dunque minimo, al contrario del colesterolo che è il loro componente principale. La componente proteica è data dall'ApoB-48 e dall'ApoE.

I residui di chilomicroni hanno il compito di trasportare il colesterolo assunto mediante la dieta al fegato per la successiva sintesi delle altre lipoproteine.

L'interazione dell'ApoE con i proteoglicani consente l'azione della lipasi epatica (HL) per l'idrolisi del rimanente contenuto di trigliceridi. Dopodiché, i chilomicroni remnant vengono assorbiti dal fegato sempre grazie all'ApoE con completa clearance plasmatica.

La loro emivita è molto breve poiché vengono degradati quasi immediatamente dal fegato.

La sintesi delle VLDL avviene a livello epatico. Sono costituite principalmente da trigliceridi (50-65%), esteri del colesterolo (16-22%), fosfolipidi (15-20%), colesterolo libero (4-8%) e apoproteine (6-10%). Le apoproteine che le compongono sono ApoB-100, ApoE ed ApoC-I/C-II/C-III.

Le VLDL sono necessarie per il trasporto al tessuto muscolare e adiposo dei trigliceridi derivanti dal metabolismo endogeno. Una volta arrivate ai tessuti target la LPL procede con l'idrolisi dei trigliceridi per rendere disponibili gli acidi grassi ai tessuti.

In seguito all'azione enzimatica le VLDL diventano IDL, che vengono rilasciate in circolo con due destini: la sintesi di LDL grazie all'enzima HL oppure l'uptake epatico mediato da ApoE. [4], [6]

Le LDL derivano dall'idrolisi delle IDL e sono costituite da esteri del colesterolo (45-50%), fosfolipidi (18-24%), apoproteine (18-22%), colesterolo libero (6-8%) e trigliceridi (4-8%). L'apoproteina che contengono è l'ApoB-100.

Nei soggetti sani la loro emivita plasmatica è di 1,5-2 giorni.

Il ruolo di queste lipoproteine è di trasportare il colesterolo endogeno al fegato e non solo mediante il riconoscimento di recettori di membrana presenti sulle cellule dei tessuti target.

Le LDL interagiscono con i loro recettori (detti LDLR) grazie all'ApoB100.

Essendo le principali responsabili del trasporto del colesterolo, l'aumento della loro concentrazione plasmatica è associata all'ipercolesterolemia, fattore di rischio per l'aterosclerosi. Per questo motivo la loro riduzione rappresenta il principale obiettivo delle terapie trattate in questa tesi. [4], [6]

Le HDL sono le lipoproteine ad alta densità e vengono prodotte a livello intestinale ed epatico. Sono costituite da fosfolipidi, esteri del colesterolo e apoproteine in percentuale superiore rispetto alle altre lipoproteine.

Il loro ruolo è quello di trasferire il colesterolo esterificato dai tessuti alle VLDL e alle LDL: così facendo le VLDL diventano LDL. Per questo motivo il metabolismo delle HDL è conosciuto come trasporto inverso del colesterolo.

Le HDL inizialmente sono costituite prevalentemente da fosfolipidi e ApoA-I. In seguito, accumulano colesterolo non esterificato dai tessuti extraepatici grazie al trasportatore ABCA1 che viene poi esterificato dall'enzima LCAT (Lecitina-Colesterolo Acil-Transferasi) collocato sulla superficie di queste lipoproteine. Le HDL che hanno accumulato colesterolo possono tornare al fegato dove si ha uno scambio di colesterolo e lipidi tra HDL ed epatociti senza endocitosi. [4], [6]

Al tempo stesso, all'aumentare del colesterolo esterificato contenuto nelle HDL queste iniziano a scambiarlo con i trigliceridi delle altre lipoproteine (es. VLDL, LDL, chilomicroni) grazie all'intervento della CEPT (Proteina per il Trasferimento degli Esteri del Colesterolo).

Le HDL aumentano in questo modo il loro contenuto in trigliceridi che subiscono poi idrolisi HL mediata nel fegato.

Il metabolismo delle HDL è conosciuto come trasporto inverso del colesterolo.

Un aspetto interessante riguarda la regolazione dei livelli plasmatici delle HDL che è effettuata dagli androgeni. Questi ormoni sono in grado di aumentare l'espressione genica dell'enzima HL: infatti, i livelli di HDL sono più bassi negli uomini rispetto alle donne. [4]

1.2. Metabolismo lipidico

Queste lipoproteine sono tutte coinvolte nel metabolismo lipidico che non è rivolto solo ai lipidi sintetizzati dal nostro organismo ma anche a quelli introdotti con la dieta.

Per questo motivo il metabolismo si distingue tra via esogena ed endogena.

La via esogena riguarda i lipidi introdotti con la dieta.

Le due tipologie di molecole che vengono assorbite dalle cellule della mucosa intestinale sono il colesterolo non esterificato e gli acidi grassi, che vengono poi utilizzati per la sintesi dei chilomicroni.

Dopo essere stati rilasciati in circolo i chilomicroni raggiungono i tessuti muscolare e adiposo, dove vengono ridotti a chilomicroni *remnant* in seguito ad idrolisi dei loro trigliceridi da parte della LPL.

Questa reazione rende disponibili gli acidi grassi ai tessuti per essere depositati oppure per essere utilizzati come fonte di energia.

Il punto di partenza della via endogena è il fegato. Nel fegato vengono assemblate le VLDL, che vengono poi rilasciate in circolo e metabolizzate ad opera della LPL. In questo caso il prodotto del metabolismo sono le IDL il cui destino è di tornare al fegato (dove vengono internalizzate grazie a endocitosi mediata da LDLR per interazione con ApoB-100 o ApoE) oppure di essere ulteriormente metabolizzate a LDL.

Le LDL sono le maggiori trasportatrici di colesterolo plasmatico (circa 2/3 del totale) e dunque di estrema importanza per il nostro organismo. Le LDL possono essere captate nei tessuti grazie all'interazione dell'ApoB-100 con i LDLR, la cui espressione regola l'uptake delle LDL.

Le HDL invece hanno il ruolo di trasportare il colesterolo extraepatico al fegato, trasferendolo a lipoproteine a bassa e molto bassa densità. [6]

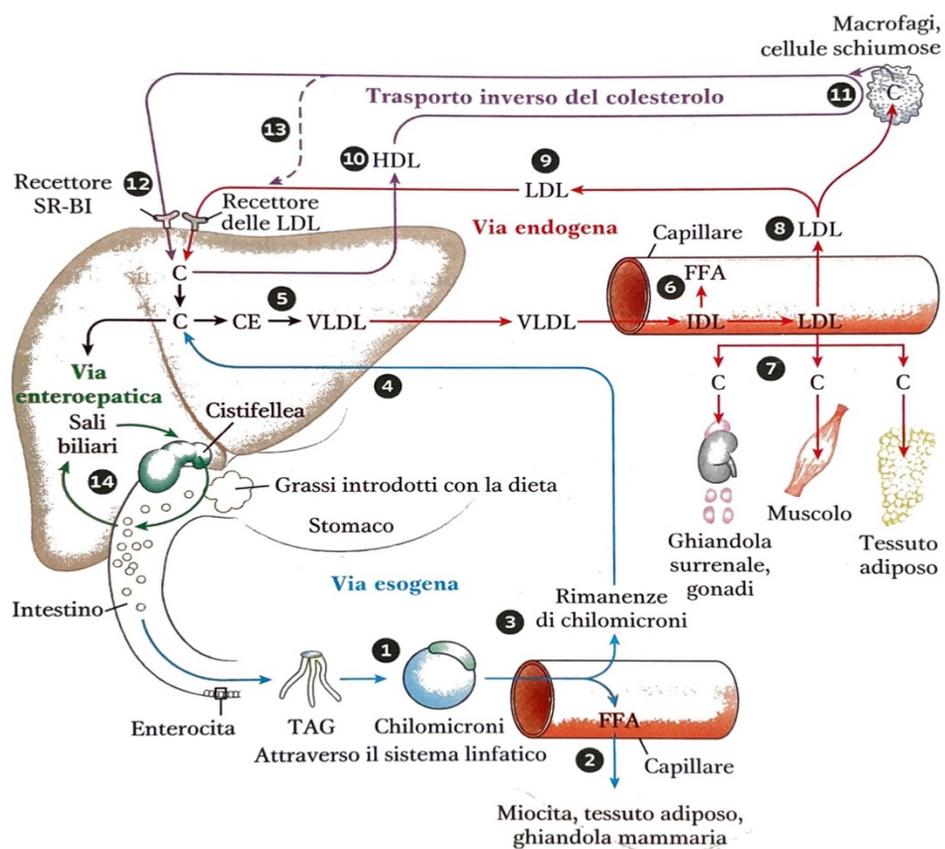


Figura 3. Schema del metabolismo lipidico distinto nelle tre vie: endogena, esogena e trasporto inverso del colesterolo.[1]

2. L'ATEROSCLEROSI

Il termine aterosclerosi è di origine greca e deriva dall'unione di due termini: *ateroma* (placca) e *sklerosis* (indurimento).

La malattia aterosclerotica cardiovascolare è una patologia con manifestazioni a carattere infiammatorio causata dall'accumulo di lipidi nella tonaca intima delle pareti delle arterie di grande calibro. [8]

2.1. Patogenesi

L'aterosclerosi è una patologia ad eziologia multifattoriale, il cui evento clinico si manifesta solo dopo un continuo accumulo di lipidi a livello endoteliale.

Infatti, non è una manifestazione clinica ma un vero e proprio processo che si può protrarre anche per tutta la vita, il cui esito finale è la manifestazione clinica: per esempio l'infarto, l'aneurisma o l'ictus. [9]

2.1.1. Lesione iniziale

L'endotelio è formato da un singolo strato di cellule che rappresentano la prima barriera dei tessuti nei confronti delle sostanze trasportate dal circolo sanguigno.

La tonaca intima delle arterie è costituita dall'endotelio insieme a fibre di collagene e di elastina. [10], [11]

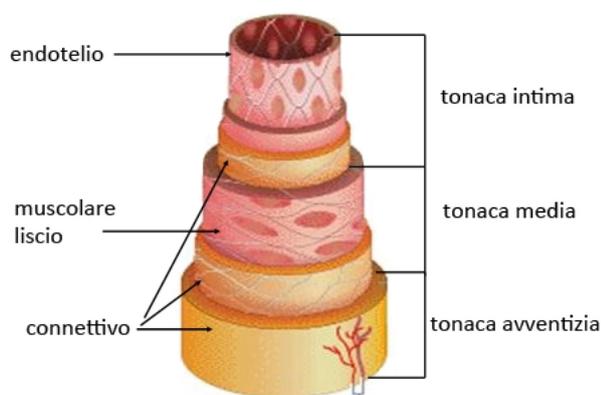


Figura 4. Anatomia schematica della parete delle arterie. A sinistra i diversi strati tissutali, raggruppati a destra nelle tre tonache. [11]

La lesione iniziale e dunque l'insorgenza dell'aterosclerosi è dovuta a una degenerazione della funzionalità dell'endotelio con aumento di permeabilità e conseguente accumulo di LDL e di altre molecole dannose nella tonaca intima. Al danno biologico contribuiscono ulteriori cause ambientali come l'iperlipidemia, l'ipertensione e il fumo. [10]

I motivi che possono portare a questa disfunzione possono essere di diversa natura come un alterato flusso sanguigno (che è infatti caratteristico dei tratti di arterie inclini a sviluppare lesioni ateromatose, come le biforcazioni) oppure una ridotta disponibilità di ossido nitrico. La sintesi dell'ossido nitrico avviene proprio nell'endotelio a partire dall'L-arginina: il suo ruolo principale è quello di promuovere il rilassamento delle fibre muscolari lisce e ridurre i fenomeni di aggregazione piastrinica. Per questo motivo la sua carenza è un fattore di rischio per l'aterosclerosi. [9], [10]

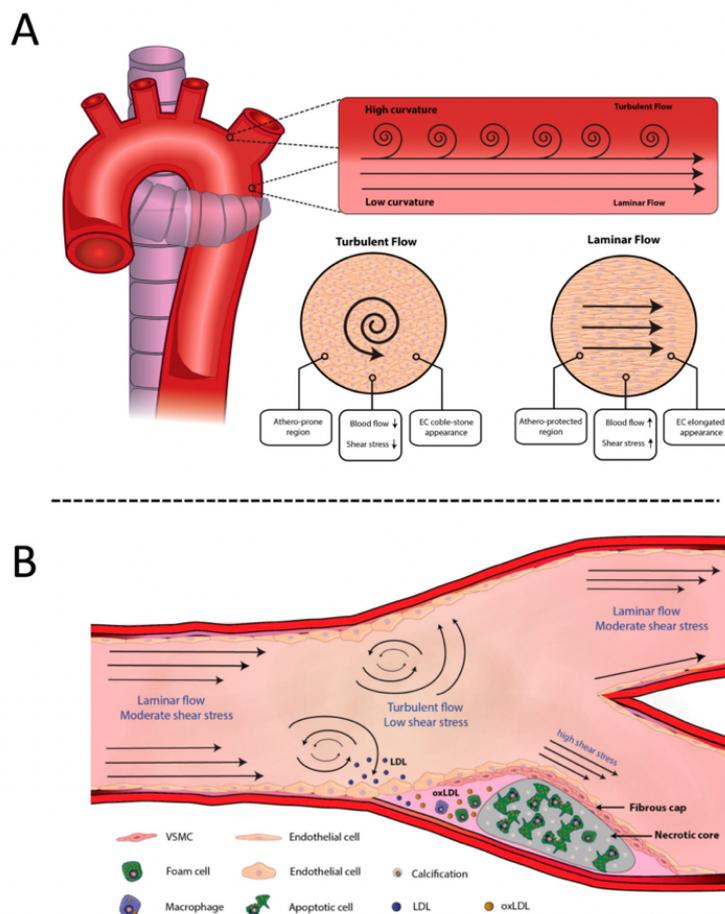


Figura 5. A. Rappresentazione del flusso sanguigno in due punti dell'aorta: dove il vaso è curvo, il flusso tenderà ad essere turbolento, con aumentata probabilità di formazione di placche ateromatose; dove l'arteria è dritta, il flusso sarà laminare, riducendo l'incidenza di placche; B. Rappresentazione del flusso all'interno di un'arteria. Lo sforzo di taglio sarà maggiore nei punti con flusso turbolento ovvero nei punti ad alta curvatura dell'arteria, come le biforcazioni o più in generale le ramificazioni. [10]

Le arterie coinvolte nel danno endoteliale sono più inclini alla vasocostrizione, allo stress ossidativo, all'infiltrazione lipidica e all'adesione leucocitaria: queste modifiche nel comportamento delle arterie portano all'infiammazione e alla conseguente formazione della stria lipidica, che rappresenta il primo stadio evolutivo della placca aterosclerotica. [10]

Il processo di accumulo lipidico parte dall'internalizzazione delle LDL all'interno dell'endotelio attraverso diffusione semplice, *tight-junctions* oppure transcitosi mediata da SR-B1 (*Scavenger Receptor B1*) o ALK1 (*A Receptor-Like 1*). [10]

All'interno dell'endotelio le LDL vanno incontro ad un processo di ossidazione da parte di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) come l'anione superossido e il radicale ossidrilico oppure ad opera delle fosfolipasi o delle lipossigenasi. [10]

Nel plasma le LDL sono protette dall'ossidazione grazie alla presenza di molecole antiossidanti come l'albumina, il tocoferolo e l'ascorbato. [10]

Anche l'ApoB100 delle LDL viene modificata dagli agenti ossidanti portando, insieme al resto delle modifiche derivanti dall'ossidazione, ad un mancato riconoscimento con il recettore per le LDLR. Per questo motivo le LDL ossidate che tornano in circolo non vengono captate da questi recettori ma dai recettori *scavenger* dell'immunità innata. [10]

Oltre all'ossidazione le LDL subiscono anche altre modifiche nell'endotelio (glicosilazione, acetilazione, aggregazione) che aumentano l'aterogenicità di queste molecole.

Una volta ossidate anche le LDL inducono delle modifiche sulle cellule endoteliali, promuovendo l'espressione di due diversi recettori: ICAM-1 e VCAM-1. Queste sono rispettivamente molecole di adesione intercellulare e vascolare, il cui ruolo è quello di permettere l'adesione dei monociti all'endotelio.

2.1.2. Stria lipidica

Dopo essere entrati per extravasazione nel tessuto endoteliale i monociti maturano a macrofagi che fagocitano le LDL ossidate grazie all'interazione con i recettori *scavenger* (SR-A o CD36). All'interno dei macrofagi il colesterolo esterificato delle LDL va incontro ad idrolisi lisosomiale per essere poi rilasciato nel citoplasma. Dopodiché viene nuovamente esterificato e conservato sotto forma di gocce lipidiche. I macrofagi che derivano da questo processo sono detti foam cells ovvero cellule schiumose (ricche in colesterolo esterificato conservato secondo queste modalità). [10]

L'intervento delle cellule immunitarie è in realtà conservativo, poiché l'azione dei macrofagi a livello endoteliale ha come scopo il contenimento delle OxLDL e dei loro danni. La stria lipidica che si forma è protettiva, utile per la rimozione dei lipidi dal torrente circolatorio.

Infatti, i macrofagi possono poi invertire il processo di accumulo lipidico uscendo dall'endotelio (portando con sé i lipidi che hanno accumulato) oppure trasferendo il colesterolo alle HDL grazie ai trasportatori ABCA1 e ABCG1. Da qui deriva l'effetto protettivo delle HDL nei confronti dell'aterosclerosi. [10]

Nel momento in cui l'attivazione endoteliale e dunque il reclutamento dei monociti diventa incontrollato, ecco che la strategia messa in atto dal nostro organismo con scopo difensivo diventa essa stessa la fonte del problema, con l'accumulo delle foam cells a livello endoteliale. [9]

Con la produzione di PDGF, TGF β e FGF (*Platelet Derived Growth Factor*, *Transforming Growth Factor beta* e *Fibroblast Growth Factor*) i macrofagi sono in grado di reclutare nella tonaca intima anche le cellule muscolari lisce della tonaca media.

Grazie ai loro recettori scavenger anche le cellule muscolari lisce possono internalizzare le OxLDL, oltre che proliferare. [9]

L'accumulo di cellule schiumose e muscolari lisce è accompagnato dall'arrivo di linfociti T nella placca, che sono in grado di produrre l'INF- γ . L'interferone gamma ha effetti inibitori sulla progressione della placca ateromatosa (riduzione della proliferazione delle cellule muscolari e riduzione dell'espressione del recettore scavenger da parte dei macrofagi) accompagnati dalla capacità contrastante di indurre un' aumentata sintesi di citochine pro-infiammatorie da parte dei macrofagi.

La lesione iniziale è dunque caratterizzata da una disfunzione endoteliale con aumentata permeabilità e conseguente ingresso ed ossidazione di lipoproteine con dimensione inferiore ai 70 nm.

L'adesione endoteliale e l'ingresso dei monociti (per reclutamento da parte delle OxLDL) comporta la formazione delle foam cells con la formazione della stria lipidica e innesco dello stato infiammatorio, seguito dal reclutamento e migrazione nell'intima delle cellule muscolari lisce, anch'esse in grado di captare le OxLDL.[9]

2.1.3. Cappuccio Fibroso

La fase successiva nella progressione dell'ateroma vede la formazione del cappuccio fibroso. Questo elemento è strettamente legato alla migrazione delle VSMCs (vascular smooth muscular cells) che sono in grado di sintetizzare collagene e fibronectina aumentando le dimensioni della placca e portando alla formazione del cappuccio subito sotto lo strato di cellule endoteliali.

La sintesi di questo componente è essenziale e protettiva a questi stadi, perché evita la rottura della placca e il riversamento del suo contenuto pro-trombotico nel lume dell'arteria.

Quindi, rispetto alla stria lipidica, la placca ateromatosa è rigida ed ingombrante: ostacola il flusso ma evita in tale stadio il riversamento del contenuto necrotico e pro-trombotico dell'endotelio. [9], [10]

Le caratteristiche strutturali del cappuccio fibroso sono predittive nei confronti dell'evento finale ovvero della rottura della placca: un cappuccio più spesso implica stabilità, al contrario dell'estensione della placca che non ha alcun legame intrinseco con la stabilità alla rottura dell'ateroma. [9]

Anche la proliferazione di cellule muscolari è indice di stabilità della placca.

2.1.4. Placca complessa

All'interno della placca è presente un core necrotico, costituito principalmente da macrofagi andati incontro ad apoptosi. Infatti, le foam cells sono sottoposte a stress continuo dovuto al consumo di ATP per l'idrolisi del colesterolo da parte dei lisosomi e per la successiva riesterificazione dello stesso.

Ad un certo punto, a causa della carenza di ATP dovuta all'ambiente ipossico, la cellula va incontro a morte. La morte dei macrofagi comporta il rilascio di lipidi e di DAMPs (damage-associated molecular pattern) che richiamano ulteriori macrofagi all'interno della lesione.

I macrofagi rilasciano anche le metalloproteasi che sono in grado di ridurre lo spessore del cappuccio fibroso. [10]

Le placche ateromatose più avanzate presentano anche accumuli di calcio, che partono dal calcio ortofosfato poi convertito a calcio fosfato amorfo e infine in strutture cristalline.

In questo caso, più grande è la placca, più sarà calcificata, ma non è detto che sia al tempo stesso anche più vulnerabile. [10]

Il destino dell'ateroma è duplice. L'esito preferibile è la formazione di una placca stabile nel tempo, che ostacola il flusso sanguigno e sulla quale si può eventualmente intervenire con

interventi chirurgici come l'angioplastica con l'inserimento di stent. La stabilità di una placca complessa può essere raggiunta grazie a interventi sulla dieta del paziente o terapie farmacologiche ipolipemizzanti.

L'esito peggiore consiste invece nella rottura dell'ateroma con fuoriuscita di tutto il suo contenuto e occlusione trombotica dell'arteria. [10]

2.1.5. Rottura della placca ateromatosa

L'evento finale consiste nella rottura della placca, con conseguente riversamento di tutto il suo contenuto nel torrente sanguigno.

La prima conseguenza di questo fenomeno è fisiologica e consiste nell'inizio dei processi di riparazione della parete dell'arteria, ovvero l'inizio della coagulazione. Al processo fisiologico si aggiungono le componenti pro-trombotiche presenti all'interno della placca, come il TF (tissue factor) che promuovono l'aggregazione piastrinica. Il TF interagisce nello specifico con il fattore VII della coagulazione per promuovere la sintesi di trombina.

Inoltre, l'attivazione delle piastrine comporta la loro sintesi di TGF- β che è in grado di promuovere la sintesi di collagene che contribuisce ad aumentare lo spessore del cappuccio fibroso, aumentando le dimensioni della placca. [10]

L'aspetto interessante di tutto ciò sta nella natura intrinseca di auto-riparazione della lesione interna da parte del nostro organismo, che in queste condizioni estreme porta ad effetti estremamente pericolosi.

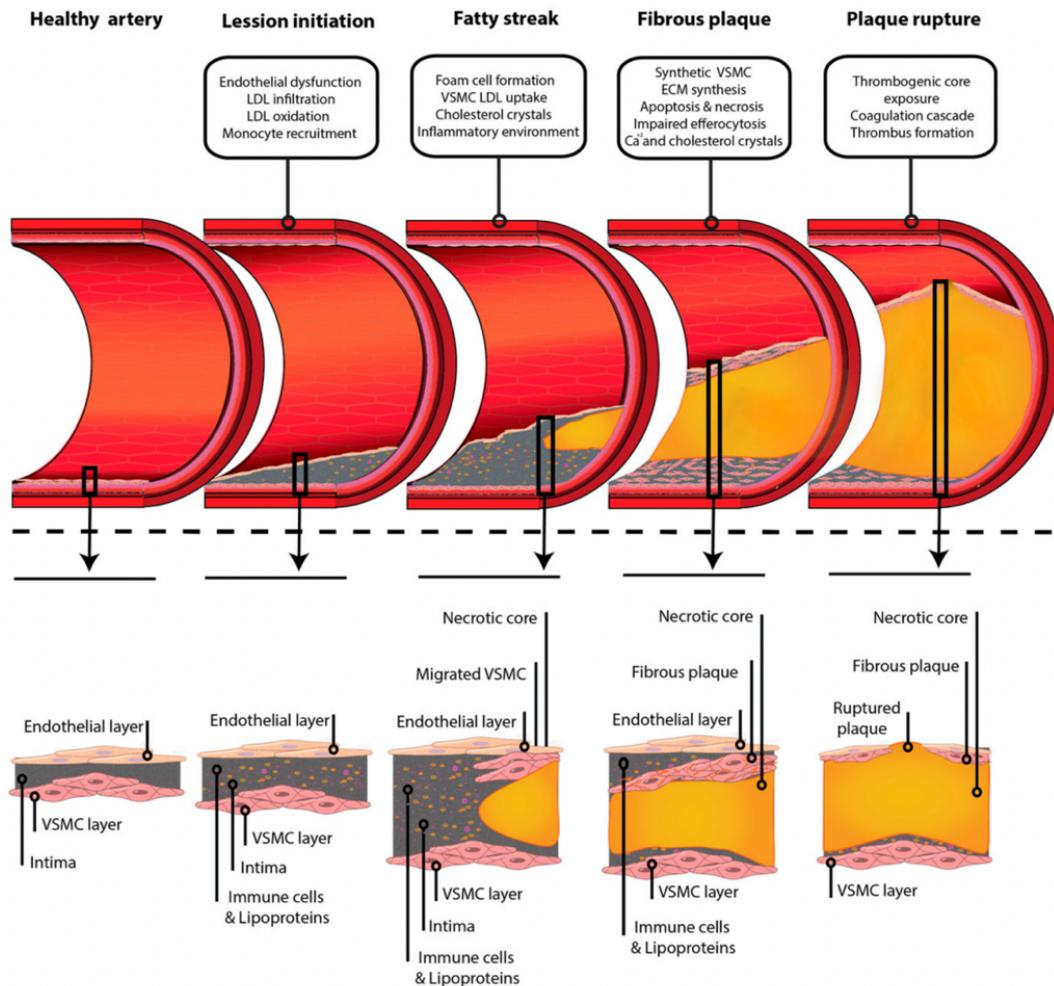


Figura 6. Evoluzione della placca aterosclerotica: dall'arteria sana fino alla rottura della placca. [10]

2.2. Outcomes cardiovascolari

Nonostante i medicinali utilizzati in terapia abbiano come scopo primario quello di tenere sotto controllo i marker dell'aterosclerosi (es. LDL, trigliceridi, proteina-C reattiva), è molto importante considerare il loro effetto finale sullo stato di salute del paziente e dunque sugli eventi cardiovascolari che possono colpire il soggetto affetto da aterosclerosi.

2.2.1. Trombo

La conseguenza più pericolosa che si può manifestare con l'aterosclerosi è la formazione di un trombo. Come trattato nel paragrafo precedente, la rottura di un ateroma comporta l'innesco della cascata della coagulazione, con conseguente formazione di un trombo nel sito della placca.

Il pericolo del trombo e di conseguenza delle placche instabili è che la loro rottura porta a un evento cardiovascolare incontrollato e repentino, il cui manifestarsi è imprevedibile e porta nel giro di pochi minuti ad infarto del miocardio. [12]

2.2.2. Embolo

La formazione di placche aterosclerotiche coinvolge principalmente l'aorta, il cui lume è più ampio rispetto alle restanti arterie. Per questo motivo, per quanto possibile, la formazione di trombi in grado di occludere completamente l'aorta è limitata. Al loro posto, la rottura della placca aterosclerotica può portare alla perdita di frammenti (emboli) che vengono trasportati dal flusso sanguigno verso vasi più stretti a livello dei quali sono in grado di ostruire il passaggio del sangue. Gli emboli possono essere di diversa natura (solida, liquida o gassosa) in base alla loro origine: se l'embolo è costituito dal trombo che si è staccato allora si parla di tromboembolia; se l'embolo è dato da frammenti di ateroma, il termine utilizzato è ateroembolia. [12]

2.2.3. Aneurisma

Nel momento in cui la placca è abbastanza stabile una conseguenza problematica della sua presenza a livello del vaso è l'aneurisma.

L'aneurisma (dal gr. *aneurysma* 'dilatazione') consiste in una dilatazione del diametro dei vasi.

All'inizio della formazione della placca un allargamento del lume è considerato fisiologico per consentire un corretto flusso sanguigno nonostante la nuova conformazione del vaso.

Nelle fasi più avanzate della lesione questo allargamento diventa patologico perché la tonaca media della parete delle arterie viene danneggiata, con conseguente perdita dell'elevata elasticità caratteristica di questi vasi. Come conseguenza il flusso sanguigno diventa irregolare e si ha una maggiore probabilità di insorgenza di trombi.

Gli aneurismi possono anche rompersi fino a causare emorragie intraperitoneali. Questo fenomeno riguarda gli aneurismi di dimensioni maggiori, con diametro superiore ai 5 cm. [12]

2.2.4. Stenosi

Il termine stenosi deriva dal greco e significa "restringimento".

L'aumento delle dimensioni della placca raggiunge livelli così elevati da portare all'occlusione del lume dell'arteria. [12]

In generale tutti questi outcome cardiovascolari portano ad ischemia ovvero ridotto se non nullo apporto di sangue agli organi e ai tessuti, in particolare miocardio e cervello. In questo modo gli organi non ricevono l'ossigeno necessario al loro funzionamento e vanno in arresto.

L'aspetto fondamentale da ricordare è che, al contrario di stenosi ed aneurismi, i trombi e gli emboli non consentono un margine di tempo abbastanza ampio da permettere al personale medico di intervenire in modo efficace, rendendoli nella maggior parte dei casi eventi fatali, prevedibili solo da diagnosi di aterosclerosi.

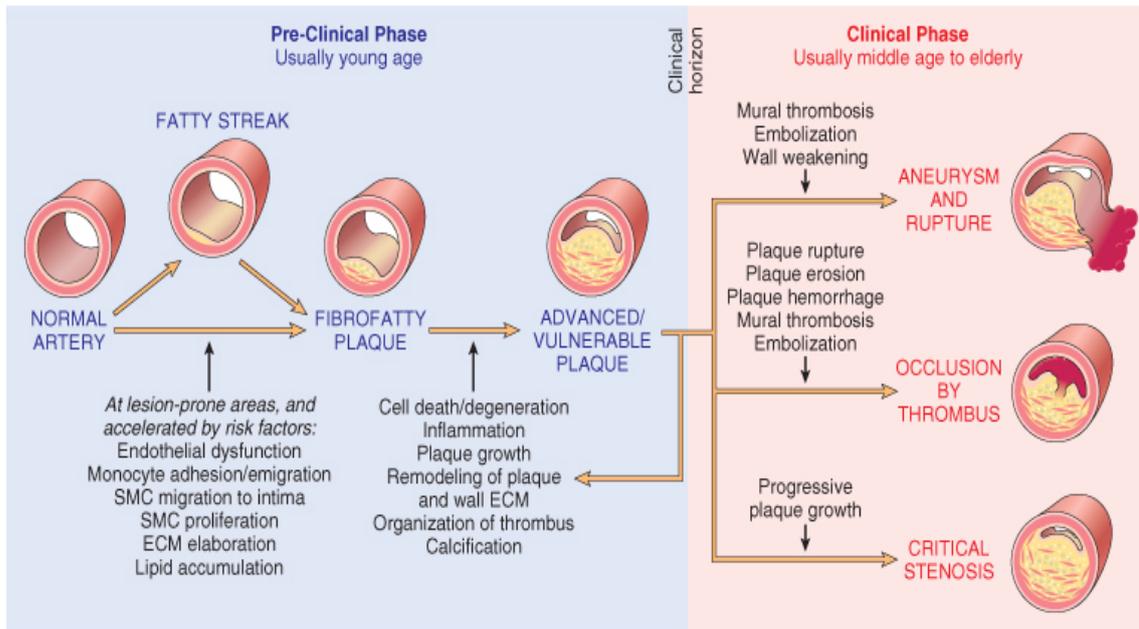


Figura 7. Suddivisione dell'aterosclerosi in fase preclinica e clinica, con i diversi outcome cardiovascolari possibili. [83]

2.3. Fattori di rischio

L'insorgenza di aterosclerosi dipende da diversi fattori, sia di natura fisiologica che ambientale.

Tra i fattori di rischio fisiologici sono annoverati l'età, il sesso e l'eventuale predisposizione ereditaria.

È noto come l'aterosclerosi sia una patologia ad esordio precoce grazie all'analisi dei vasi di pazienti giovani (dai 10 ai 14 anni) morti per cause accidentali. Nonostante la formazione della stria lipidica si possa verificare già a queste età, lo stadio clinico si verifica con il passare del tempo, solitamente tra i 40 e i 70 anni, rendendo le popolazioni in questa fascia d'età quelle più a rischio.

Anche il sesso sembra giocare un ruolo importante nell'insorgenza della patologia, con le donne che presentano una minore incidenza di aterosclerosi fino all'inizio della menopausa. In questo senso l'effetto protettivo è da attribuire agli estrogeni, il cui utilizzo in terapia non ha però portato ad alcuna protezione nelle donne in menopausa.

Anche la genetica è coinvolta nel rischio di sviluppo di questa malattia, in particolare in pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare o predisposti alle iperlipidemie (come l'ipercolesterolemia) e all'ipertensione.

Un paziente iperteso ha un rischio cinque volte superiore di avere un infarto rispetto a un paziente non iperteso. [9]

I fattori di rischio ambientali riguardano invece la dieta, il fumo e l'attività fisica.

Il primo intervento terapeutico messo in atto in pazienti a basso rischio è quello sulla dieta. Una dieta adeguata ha un'influenza elevata sui lipidi esogeni, contribuendo a una riduzione dei loro livelli plasmatici. La dieta non viene poi abbandonata come coadiuvante in alcun tipo di terapia ipolipemizzante, a partire dalle statine.

Anche il diabete rappresenta un fattore di rischio per l'aterosclerosi: i pazienti diabetici sono a maggior rischio di ipercolesterolemia, con conseguente aumento del rischio cardiovascolare.

Valori elevati di omocisteina rappresentano un ulteriore fattore di rischio per l'aterosclerosi. L'omocisteina è un amminoacido essenziale che a concentrazioni elevate causa danno endoteliale e regola l'azione dell'NO in senso negativo. [9]

2.3.1. Ipercolesterolemia

L'ipercolesterolemia e quindi concentrazioni plasmatiche elevate di colesterolo (che nel plasma viene valutato in base alle concentrazioni di LDL-C) restano il principale elemento di indagine per valutare la salute del sistema cardiovascolare e per la diagnosi di aterosclerosi.

L'ipercolesterolemia può derivare da una dieta errata o da mutazioni genetiche, come descritto nel paragrafo successivo.

Per quanto riguarda l'ipercolesterolemia acquisita questa viene diagnosticata con valori di LDL-C superiori a 100 mg/dL e di colesterolo totale (CT) superiori a 200 mg/dL. [13]

In questo caso il primo intervento necessario è quello sulla dieta. Se l'approccio dietetico non dovesse portare ad una riduzione della concentrazione plasmatica dell'LDL-C diventa necessario l'intervento con una terapia ipocolesterolemizzante.

In questo caso le terapie standard come statine, ezetimibe e resine risultano essere efficaci, data la presenza e il funzionamento dell'LDLR.

2.3.2. Ipercolesterolemia familiare

L'ipercolesterolemia familiare (FH) è una malattia genetica a trasmissione autosomica dominante, la cui esistenza è stata descritta per la prima volta più di 125 anni fa. Inizialmente si credeva si trattasse di una patologia cutanea per la presenza degli xantomi tendinei e degli xantelasmi. Gli xantomi sono degli accumuli di lipidi fagocitati da macrofagi che si creano a livello tendineo oppure sulle palpebre (xantelasmi). [14], [15]



Figura 8. Fotografia delle mani di una paziente di 18 anni affetta da HoHF (Ipercolesterolemia Familiare Omozigote) [15]

I pazienti affetti da FH presentano livelli di colesterolo LDL nettamente superiori rispetto alla norma sin dalla nascita.

La variante eterozigote è caratterizzata da livelli di LDL-C ≥ 160 mg/dL nei bambini e LDL-C ≥ 190 mg/dL negli adulti.

La variante omozigote è caratterizzata da una concentrazione plasmatica di LDL-C ≥ 400 mg/dL e uno od entrambi i genitori con diagnosi di FH. [14]

Le mutazioni note che portano a questa patologia riguardano il gene per il recettore delle LDL, il gene codificante per l'ApoB, quello per l'Apo E ed il gene della proteina PCSK9 che subisce una mutazione *gain-of-function*.

Le mutazioni a carico del recettore per le LDL sono quelle più frequenti e le prime ad essere state identificate come causa della malattia da Goldstein e Brown. Tali mutazioni sono più di 1200 e vengono distinte per praticità in 6 classi in base al loro effetto sulla sintesi del recettore.

Una classificazione più semplice le distingue in mutazioni che portano a una deficienza di LDLR e mutazioni che causano la sintesi di LDLR difettoso.

Per questo motivo, spesso i pazienti affetti da FH sono resistenti alle terapie il cui meccanismo ipocolesterolemizzante è LDLR-dipendente (es. statine). [14]

Questa malattia espone i pazienti ad un aumento del rischio cardiovascolare, con alta incidenza di aterosclerosi ed eventi cardiovascolari precoci (attorno ai trent'anni).

I pazienti con FH e una funzionalità residua di LDLR inferiore al 2% hanno un'aspettativa di vita inferiore ai 20 anni se non trattati. [14]

2.4. Approcci terapeutici

Come già delineato, l'aterosclerosi è una patologia ad eziologia multipla e a carattere infiammatorio. Per poterla trattare è necessario considerare diversi approcci terapeutici, sia farmacologici che non farmacologici.

La terapia più adatta viene valutata dal medico sulla base delle cause dell'aterosclerosi e del rischio cardiovascolare a cui è esposto il paziente, anche sulla base della progressione della malattia al momento della diagnosi.

Una diagnosi precoce resta il miglior alleato per un intervento adeguato ed efficace con un buon miglioramento del quadro clinico del paziente.

Infatti, è noto come l'aterosclerosi resti una malattia silente fino alla manifestazione dell'evento clinico. È importante tenere sotto controllo la salute del nostro sistema cardiovascolare a partire dalla dieta e dall'esercizio fisico.

Questa tesi si concentra sull'analisi delle terapie standard e innovative attualmente disponibili in commercio per il trattamento della causa primaria dell'aterosclerosi ovvero l'ipercolesterolemia. Infatti, come sarà possibile notare, l'approvazione di queste terapie deriva nella maggior parte dei casi dalla loro efficacia nel ridurre i livelli plasmatici di LDL-C, marker ampiamente dimostrato dell'aterosclerosi.

Solo successivamente viene valutato il loro impatto sullo sviluppo della patologia, quando è possibile testare la terapia su coorti più ampie e per più tempo.

Per questo motivo, alcune terapie di più recente approvazione non sono ancora state valutate negli outcome cardiovascolari.

3. TERAPIE STANDARD

Nel trattamento delle dislipidemie di gravità maggiore e dell'aterosclerosi esiste un buon panorama di terapie farmacologiche efficaci alle quali attualmente si fa riferimento per il controllo del profilo lipidico plasmatico.

La principale classe di farmaci è quella delle statine, che si sono dimostrate le più efficaci nella riduzione del colesterolo LDL.

Inoltre, viene utilizzato l'ezetimibe, che agisce con un meccanismo alternativo e che risulta essere molto utile come coadiuvante alla terapia con statine, quando queste ultime non sono tollerate o non sono sufficienti al raggiungimento degli obiettivi terapeutici.

I sequestranti degli acidi biliari sono un'altra terapia consolidata, utile nella riduzione del colesterolo plasmatico e con effetto locale a livello gastrointestinale.

Per ultima la plasmaferesi extracorporea resta un trattamento non farmacologico essenziale nella gestione dell'aterosclerosi e del rischio cardiovascolare ad essa associato.

3.1. Statine

La scoperta delle statine risale al 1976: la prima ad essere stata scoperta è la mevastatina, isolata a partire da due specie del fungo *Penicillium*. [6]

Questa molecola presentava una caratteristica strutturale poi rivelatasi comune a tutte le statine, ovvero un anello lattonico chiuso a sei elementi, inattivo.

Idrolizzando l'anello, è possibile ottenere una molecola estremamente reattiva, in grado di inibire l'enzima HMG-CoA reduttasi (3-idrossi-3metilglutaril-coenzimaA reduttasi) grazie all'analogia strutturale con l'acido mevalonico, anche lui inibitore competitivo dell'HMG CoA reduttasi. [4]

L'inibizione dell'enzima avviene con un'affinità pari a 10000 volte tanto quella del substrato naturale, ovvero l'HMG-CoA.[6]

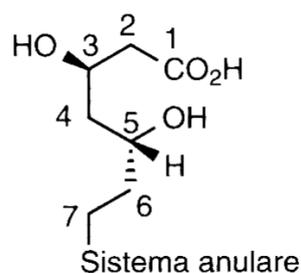


Figura 9. Struttura dell'anello lattonico, idrolizzato, caratteristico delle statine. Chimicamente è un acido 3,5-diidrossieptanoico 7-sostituito.[6]

È stato dimostrato che l'attivazione delle statine, che sono a tutti gli effetti dei profarmaci, avviene a livello intestinale ed epatico, dove l'anello viene idrolizzato, si apre e dà origine al derivato β-idrossiacido. [4].

In questo caso quindi, la biotrasformazione e la corretta funzionalità epatica risultano essere un elemento fondamentale ai fini dell'azione farmacologica.

Ad oggi, gli inibitori dell'enzima HMG-CoA reduttasi rappresentano il trattamento di prima linea nel trattamento dell'aterosclerosi e sono la principale terapia di confronto negli studi con tale endpoint primario. [4]

3.1.1. Meccanismo d'azione

Come accennato precedentemente, le statine sono una classe di farmaci inibitori dell'HMG-CoA reduttasi. Il ruolo di tale enzima è fondamentale nel nostro organismo, in quanto coinvolto nella sintesi del colesterolo. In particolare, agisce da catalizzatore in uno dei primi passaggi del processo.

La sintesi del colesterolo avviene, come per gli acidi grassi, a partire dall'Acetil-Coenzima A.

Nella via sintetica, possono essere distinti quattro step fondamentali.

- I. Inizialmente, tre molecole di acetil-CoA condensano, per ottenere il mevalonato.
- II. L'acetil-CoA transferasi, catalizza la prima reazione, portando alla formazione di acetoacetil-CoA. L'HMG-CoA sintasi catalizza la condensazione della terza molecola di acetil-CoA, formando il β-idrossi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA).
A questo punto, l'HMG-CoA reduttasi, promuove la conversione dell'HMG-CoA in mevalonato.
- III. Il mevalonato viene convertito in due unità isopreniche attivate.

Sei delle unità isopreniche precedentemente ottenute, vengono fatte polimerizzare per ottenere lo squalene, che prende il nome dal fatto di essere stato isolato per la prima volta dal fegato di uno squalo.

- IV. L'ultimo passaggio vede la ciclizzazione dello squalene, che è una molecola a trenta atomi di carbonio con ramificazioni. Il primo enzima che interviene è la squalene monoossigenasi, che dà vita ad un epossido. A partire dall'eossido, grazie a delle ciclasi, si ottiene il colesterolo, che è costituito da un nucleo steroideo a quattro anelli.[1]

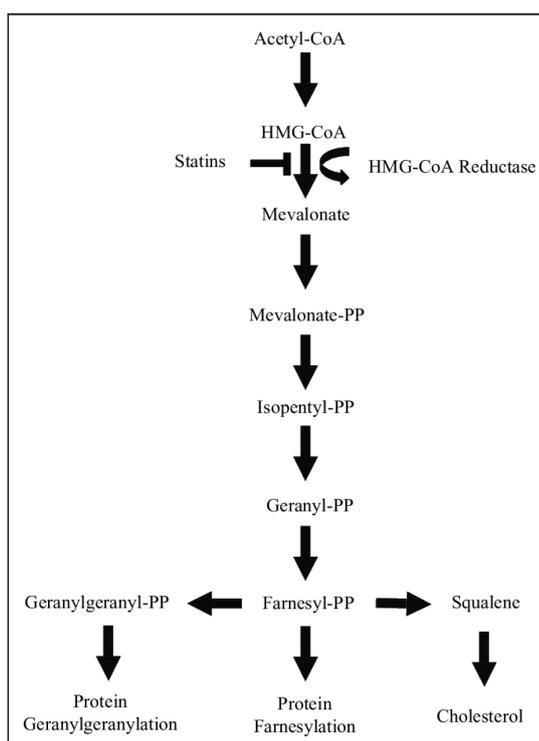


Figura 10. Pathway biosintetico del colesterolo, che riporta evidenziato lo step in cui intervengono le statine. L'attività dell'HMG-CoA è anche naturalmente regolata sulla base delle concentrazioni intracellulari di colesterolo, con un meccanismo a feedback negativo. A breve termine invece, possono regolare la sua concentrazione alcuni ormoni metabolici, ovvero insulina e glucagone. La prima ne promuove la defosforilazione e quindi conseguente attivazione, al contrario del glucagone che ne stimola la fosforilazione, disattivandolo. [84]

Oltre al loro ruolo di inibitori enzimatici, le statine possono agire sulla riduzione dei livelli di LDL-C anche per altre vie. Sono infatti in grado di aumentare l'assorbimento epatico delle LDL-C e di ridurre i precursori delle VLDL.

Infatti, la riduzione della sintesi di colesterolo, dovuta all'inibizione dell'HMG-CoA reduttasi, comporta un'aumentata necessità di captare quello plasmatico, con conseguente aumento dell'esposizione dei recettori epatici per le LDL-C.

Questi recettori rimuovono normalmente il 75% circa delle LDL-C circolanti; dunque, una terapia farmacologica (o dietetica) che agisca sull'aumento dell'espressione di tali recettori, risulta essere molto efficace.[4]

Nello specifico, è stato verificato che: la riduzione di LDL-C conseguente all'assunzione della maggior parte delle statine, è superiore nei pazienti in grado di sintetizzare i recettori epatici per le LDL-C, mentre non è adeguata nei pazienti che, soffrendo di patologie quali l'ipercolesterolemia familiare omozigote, non li possono sintetizzare.

Questo ci fa comprendere l'importanza che assume l'azione sui recettori per le LDL delle statine, oltre che quella sull'enzima HMG-CoA reduttasi. [6]

3.1.2. Farmacocinetica

Attualmente si possono trovare in commercio: Lovastatina, Simvastatina, Pravastatina, Fluvastatina, Atorvastatina, Pitavastatina, Rosuvastatina.

Tutte queste molecole sono accomunate da una serie di caratteristiche strutturali, pur avendo altrettante caratteristiche che le distinguono le une dalle altre, consentendo diversi regimi di utilizzo nel trattamento di diverse tipologie e gravità di dislipidemie.[6]

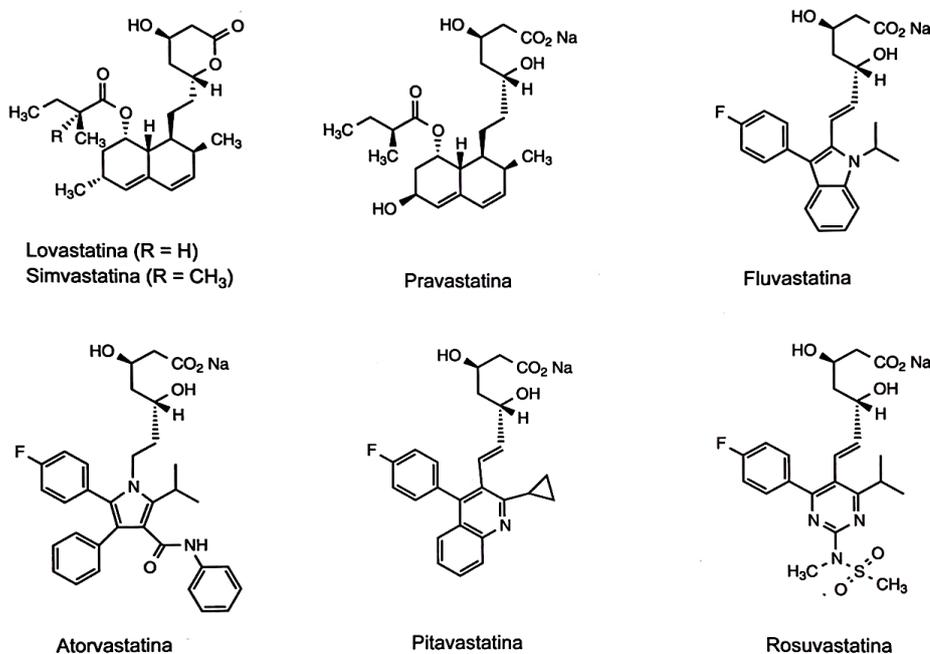


Figura 11. Struttura delle statine attualmente disponibili in commercio. È possibile notare la differenza tra lovastatina e simvastatina che sono profarmaci, aventi l'anello lattonico non idrolizzato, rispetto alle altre. [6]

Sono molecole caratterizzate da una porzione polare, ovvero l'anello lattonico, che può essere chiuso ed idrolizzabile nel caso dei profarmaci come lovastatina e simvastatina, oppure già idrolizzato come nelle altre statine.

L'anello lattonico idrolizzato ha il compito di interagire con l'HMG-CoA reduttasi fungendo da falso substrato e bloccando quindi l'enzima.

Oltre alla testa polare è presente una porzione idrofobica, che varia da statina a statina e che ha il compito di rafforzare il legame con l'enzima, attraverso interazioni con amminoacidi stericamente vicini al sito catalitico. Infatti, la porzione idrofobica può promuovere l'affinità del farmaco per il target, modificandone la durata d'azione.

In particolare, funzionalizzando il sistema biciclico lipofilo di lovastatina e simvastatina, con sostituenti più idrofili, come un ossidrilico in beta (caso della pravastatina), è possibile aumentare l'idrofilia della molecola, evitando il suo ingresso nelle cellule dei tessuti periferici e promuovendone la selettività a livello epatico.

Al contrario, un aumento della lipofilia nella porzione idrofobica, come si ottiene in atorvastatina, fluvastatina e rosuvastatina per aggiunta di un fluorofenile, aumenta l'affinità della molecola per l'enzima. [6]

Sia lovastatina che simvastatina vengono metabolizzate dal CYP3A4, che promuove l'ossidazione a metaboliti attivi.

Anche le altre statine, pur essendo già attive, subiscono metabolismo di primo passaggio.

Sia l'atorvastatina che la rosuvastatina danno vita a metaboliti con potenza analoga oppure inferiore, ma comunque attivi e presenti in circolo, quindi in grado di contribuire all'attività finale del farmaco.

Essendo metabolizzate dal CYP3A4 e la fluvastatina dal CYP2C9, presentano interazioni con tutti i farmaci in grado di indurre o inibire queste isoforme, come ad esempio, eritromicina, claritromicina, fenitoina, antifungini azolici.[6][4]

Sono molecole prettamente lipofile, con logP superiore a 1. Hanno infatti, generalmente, un'alta percentuale di legame alle proteine plasmatiche, e una bassa biodisponibilità per via orale, dovuta all'alto tasso di metabolismo di primo passaggio.[4], [6]

L'emivita delle statine è di poche ore, fatta eccezione per atorvastatina e rosuvastatina, che raggiungono le 14-20 h.[4], [6]

Per quanto riguarda le modalità di assunzione, il loro assorbimento non subisce importanti modifiche quando assunte con del cibo, ad eccezione della lovastatina, la cui assunzione ai pasti è consigliata.

A causa del loro meccanismo d'azione, è preferibile assumerle prima di andare a dormire, in modo tale da far coincidere la loro azione con il picco di sintesi del colesterolo. Nel caso di atorvastatina e rosuvastatina, data la loro lunga emivita, questa accortezza non è strettamente necessaria.

La via di eliminazione principale è quella fecale, data la loro natura lipofila, per quanto esista una bassa percentuale di escrezione renale.[4], [6]

Come già accennato in precedenza, nel momento in cui si intraprende una terapia con questi farmaci è importante che il medico valuti eventuali insufficienze epatiche o renali ed eventualmente, quando possibile, aggiusti il dosaggio in base alle necessità, riducendone la dose.

Tutte queste molecole sono state approvate per il trattamento dell'ipercolesterolemia primaria, mentre il trattamento di altri tipi di dislipidemie è affidato, più nello specifico, ad uno od all'altro tipo di statina.

Per esempio, non sono state approvate per la prevenzione primaria di eventi cardiaci fluvastatina e pitavastatina, mentre la fluvastatina viene utilizzata nella prevenzione secondaria. [6]

È importante considerare la classificazione delle statine in azione a bassa, moderata o alta intensità.

L'intensità è stabilita sulla base della percentuale di riduzione di LDL a cui, quella dose di quella statina, porta.

Statine che portano a una riduzione dei livelli plasmatici di LDL al di sotto del 30%, sono definite a bassa intensità; una percentuale di riduzione che va dal 30 al 50% caratterizza le statine ad intensità moderata, mentre 50% o più è garantita dalle statine ad alta intensità.

Tra quelle ad alta intensità troviamo la rosuvastatina a dosaggi relativamente bassi, di 20-40 mg, insieme alla atorvastatina, a dosaggi più elevati di 40-80 mg.[4]

HIGH-INTENSITY STATINS	MODERATE-INTENSITY STATINS	LOW-INTENSITY STATINS
Lower LDL-C by $\geq 50\%$	Lower LDL-C by 30% to $< 50\%$	Lower LDL-C, on average, by $< 30\%$
Atorvastatin 40–80 mg Rosuvastatin 20–40 mg	Atorvastatin 10 mg (to 20 mg) Fluvastatin 40 mg twice daily Fluvastatin XL 80 mg Lovastatin 40 mg (to 80 mg) Pitavastatin 1–4 mg Pravastatin 40 mg (to 80 mg) Rosuvastatin (5 mg) to 10 mg Simvastatin 20–40 mg	Fluvastatin 20–40 mg Lovastatin 20 mg Pravastatin 10–20 mg Simvastatin 10 mg

Figura 12. Statine e dosaggi attualmente disponibili in commercio, suddivisi sulla base della capacità percentuale di riduzione dei livelli di LDL-C plasmatici. [4]

3.1.3. Effetti avversi

Ad oggi, sono farmaci ben tollerati, pur presentando, in alcuni casi, effetti collaterali problematici per il paziente.

Le statine inducono un aumento delle transaminasi epatiche per tutta la durata della terapia, anche se poi tornano a livelli normali, non appena viene interrotta l'assunzione del farmaco.

Infatti, dal 2012, il monitoraggio epatico di routine non è più indicato dall'FDA, in quanto non è in grado di prevenire o rilevare danni epatici gravi.

Sono stati identificati casi di mialgia, o addirittura, in rari casi, rabdomiolisi, caratterizzata da necrosi muscolare, con rilascio di mioglobina dalle cellule del muscolo scheletrico e conseguente tossicità renale. Gli effetti collaterali a livello muscolare sono correlabili all'utilizzo di dosi più elevate di statine.

L'utilizzo di questi farmaci è controindicato in gravidanza, data l'enorme importanza del colesterolo nello sviluppo fetale. Essendo poi escreti nel latte materno, è altrettanto importante che non vengano assunti durante l'allattamento.[4]

3.1.4. Terapia

Le statine sono uno strumento fondamentale nel trattamento delle dislipidemie. In particolare, è fondamentale il loro ruolo nella riduzione del colesterolo LDL.

Sulla base della gravità della malattia, possono essere utilizzati i diversi tipi di statine, che presentano performance diverse, come emerso dal RACING trial.[16]

Nel RACING trial sono stati messi a confronto gli effetti delle 4 tipologie di statine più prescritte al tempo, in pazienti con ipercolesterolemia, evincendo un netto distacco di performance tra la rosuvastatina e le altre tre, ovvero atorvastatina, simvastatina e pravastatina. Il confronto è stato effettuato sui dosaggi autorizzati dall'FDA al momento dello studio.

In particolare, è stato studiato come la rosuvastatina fosse in grado di ridurre i livelli plasmatici di LDL in media dell'8,2% in più rispetto all'atorvastatina.

Inoltre, nonostante il paragone tra rosuvastatina 10 mg vs 10,20,30,40 mg degli altri principi attivi, la riduzione dei livelli plasmatici di LDL non solo restava sempre significativamente inferiore rispetto a quella ottenuta con rosuvastatina 10 mg, ma non risultava aumentare in modo significativo tra dosaggio e dosaggio dello stesso principio attivo.

È molto importante tenere conto di questo aspetto, in quanto, alti livelli di riduzione delle LDL sono ottenibili con il dosaggio minimo, ovvero 10 mg, di rosuvastatina.[16]

Infatti, rosuvastatina e pravastatina garantiscono in generale una migliore compliance e tolleranza da parte dei pazienti, in particolare quelli affetti da mialgie.[4]

Un altro studio è andato a valutare, all'interno del RACING trial, gli effetti dell'utilizzo di statine a media intensità in associazione con ezetimibe, contro gli effetti ottenuti dall'utilizzo di statine ad alta intensità in monoterapia. La valutazione dei due regimi terapeutici è stata fatta stratificando i soggetti del RACING trial in quelli con diabete mellito e ASCVD (Atherosclerotic Cardiovascular Disease).

Con questo studio, si è visto che non esiste differenza statisticamente significativa tra le due terapie nel trattamento di questa coorte di pazienti, per la prevenzione di morte cardiovascolare, eventi cardiovascolari importanti o infarto non fatale.

L'interruzione del trattamento o la riduzione della dose dovuta ad intolleranza al farmaco vede una differenza statisticamente significativa tra i due regimi terapeutici, dove la terapia di associazione presenta un tasso inferiore.

Inoltre, per quanto riguarda la riduzione dei livelli di LDL plasmatici, sempre la terapia di associazione statina a media intensità con ezetimibe, ha registrato una maggiore efficacia, rispetto a quella della monoterapia con statina ad alta intensità.

Dunque, sicuramente, nei pazienti intolleranti o poco responsivi alla terapia con statine ad alta intensità, può essere proposta una modifica della terapia, con l'associazione studiata, per cercare di raggiungere livelli di LDL inferiori ai 70 mg/dL.[17]

Nel 2022 è stato pubblicato un ulteriore studio, che ha consentito di valutare l'utilizzo, e quindi l'andamento delle prescrizioni di statine ad alta intensità, tra i pazienti con aterosclerosi negli US. Tra i soggetti, è stata studiato un alto tasso di utilizzo di statine nella fascia di età tra i 45 e i 74 anni, età alla quale viene anche assunto il maggior numero di statine ad alta intensità.

Tra questi pazienti però, le statine vengono assunte prevalentemente dagli uomini, al contrario delle donne che inoltre, quando le assumono, tendono ad avere una terapia non a base di statine ad alta intensità.

Dato molto interessante, è quello riguardante la percentuale di soggetti studiati, e quindi con ASCVD, che al momento di studio non erano in terapia con statine, ovvero il 49.9%. La maggior parte di questa percentuale si colloca nella fascia di età più bassa e tra le donne.

Questo sta a indicare la presenza di notevoli carenze nella terapia di pazienti già identificati come malati, che ragionevolmente porteranno ad una maggiore incidenza di morte o problematiche associate alla malattia. [18]

Dunque, l'utilizzo di questa classe terapeutica resta un caposaldo nel trattamento dell'ipercolesterolemia, soprattutto in pazienti che necessitano la prevenzione primaria di eventi cardiovascolari. Resta un trattamento sicuro e confermato, altamente tollerato.

Certo che bisogna garantirne l'assunzione ed eventualmente supportare la compliance del paziente, che è data non solo dalla tolleranza ma anche dal raggiungimento dell'obiettivo terapeutico, eventualmente utilizzando associazioni già sperimentate, o affidandosi ad altri farmaci nel momento in cui le statine non dovessero risultare efficaci nel paziente. Questo è il caso di patologie genetiche come l'ipercolesterolemia familiare omozigote, dove caratteristiche intrinseche del paziente rendono necessario un approccio alternativo.

3.2. Ezetimibe

L'ezetimibe è una molecola altamente insolubile, caratterizzata dalla presenza di un anello 1,4-diaril- β -lattamico, indispensabile per la sua azione farmacologica.

Viene utilizzato in terapia per la riduzione del colesterolo totale e anche dell'LDL-C, del quale è in grado di ridurre i livelli plasmatici fino al 15-20%. [4]

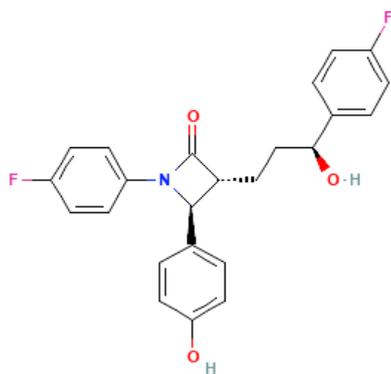


Figura 13. Struttura molecolare dell'ezetimibe. [85]

3.2.1. Meccanismo d'azione

L'ezetimibe viene assunto per via orale, attraverso la quale raggiunge l'intestino tenue dove espleta la sua azione farmacologica. Infatti, è in grado di inibire un trasportatore di membrana, l'NPC1L1, ovvero il Niemann-Pick C1-like, che si trova sulle cellule epiteliali dell'intestino tenue.

NPC1L1 è una proteina altamente N-glicosilata, omologa alla NPC1 (Niemann-Pick C1 protein). La sua struttura è caratterizzata da tredici domini transmembrana, dei quali cinque costituiscono lo SSD, Sterol-Sensing Domain. Questo dominio non è esclusivo di questa proteina: infatti, può essere riconosciuto anche nella sua omologa NPC1, come nell'HMG-CoA reduttasi.

Non è un trasportatore ubiquitario; nella maggior parte delle specie è possibile trovarlo a livello dell'intestino tenue, mentre negli umani e nei primati è espresso in parte anche a livello epatico.[19]

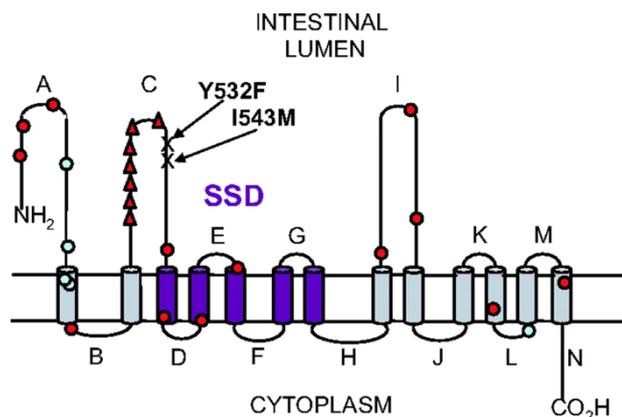


Figura 14. Modello 2D del trasportatore NPC1L1 per il colesterolo, situato a livello della membrana apicale dell'enterocita. È possibile identificare il dominio N terminale extracellulare e il C terminale intracellulare, fondamentale per la successiva endocitosi. Cinque domini transmembrana costituiscono lo Sterol Sensing Domain, ed il loop "C" è risultato essere fondamentale nel legame con il farmaco. [86]

Il colesterolo si lega nell'intestino ad acidi biliari, fosfolipidi, trigliceridi idrolizzati, formando delle micelle miste, che consentono allo stesso di attraversare lo strato acquoso che riveste la superficie luminale degli enterociti. Una volta raggiunta la membrana apicale delle cellule, il colesterolo si lega all'estremità N-terminale di NPC1L1, ad un loop ricco di cisteine, e viene così internalizzato per endocitosi mediata da clatrina.[19]

Nell'endocitosi mediata da clatrina, funge da segnale un tetrapeptide presente nell'estremità C-terminale dell'NPC1L1. Questa estremità viene anche definita YVNXXF: si stacca dalla membrana cellulare a cui era legata e si lega ad una proteina Numb. Dopodiché, la proteina Numb lega la Clathrin Adaptor Protein (AP2) e conseguentemente anche la clatrina.

Si formano delle vescicole rivestite da AP2 e clatrina, che sono in grado di internalizzare NPC1L1, trasportandolo all'endosoma, dove viene separato dal colesterolo e quindi riciclato sulla membrana apicale. Il colesterolo invece, viene portato al reticolo endoplasmatico.[20]

Il colesterolo riconosciuto da NPC1L1 è colesterolo non-esterificato: una volta raggiunto il reticolo endoplasmatico, questo viene esterificato e utilizzato, insieme a trigliceridi, apolipoproteina B48 e colesterolo non esterificato, per sintetizzare i chilomicroni.[19]

L'ezetimibe si lega al trasportatore intestinale del colesterolo, riducendone l'assorbimento. Oltre al colesterolo, inibisce anche l'assorbimento dei fitosteroli, poiché anche il loro assorbimento dipende da NPC1L1. Infatti, possono essere utilizzati negli studi, come marker plasmatici per l'assorbimento del colesterolo.

L'effetto finale è di riduzione dei livelli plasmatici di colesterolo, che ovviamente comporta, come nel caso delle statine, un aumento dell'espressione dei recettori epatici per LDL-C.

Dal lato opposto, si verifica anche un aumento compensatorio della sintesi endogena di colesterolo, che comunque non rende vana l'azione del farmaco.[4]

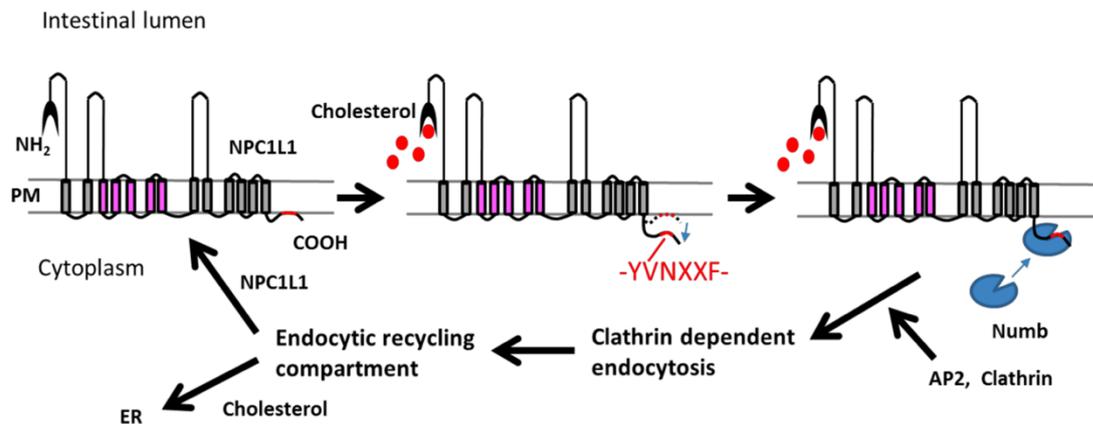


Figura 15. Immagine rappresentativa del meccanismo di assorbimento del colesterolo attraverso il trasportatore transmembrana NPC1L1. Il processo avviene per endocitosi clatrina mediata. [20]

3.2.2. Farmacocinetica

L'ezetimibe viene somministrato per via orale, ma la sua biodisponibilità non è valutabile, poiché non consente, a causa della sua elevata idrofobia, l'allestimento di una sua forma iniettabile.

Per valutarne l'assorbimento, si fa quindi riferimento ai dati dell'AUC, che consentono di stabilire una quota di assorbimento per via orale tra il 35 e il 60%.

È un farmaco attivo come tale, che va incontro a metabolismo, sia a livello intestinale che epatico. In particolare, viene metabolizzato a glucuronide attivo, ri-escreto con la bile e poi in grado di agire come tale sul trasportatore NPC1L1.

Una volta nel sangue, presenta un'alta affinità di legame con le proteine plasmatiche, con un'emivita di circa 22 ore totali.[6]

Per poter espletare il suo meccanismo d'azione, è stato dimostrato come sia essenziale la presenza dell'anello 1,4-diaril- β -lattamico, che gli consente di legarsi al recettore.

È una molecola altamente lipofila, con un logP di 3.50, però la presenza dei due gruppi OH garantisce la sua azione a livello dell'intestino tenue: la sua pKa è di 9.7 dunque a livello dell'intestino tenue, dove il pH è all'incirca 7.2-7.4, il farmaco si trova soprattutto nella forma non ionizzata.[6]

Viene eliminato per la maggior parte per via fecale, mentre in minima parte come metabolita glucuronidato, per via urinaria.[4]

3.2.3. Effetti avversi

L'ezetimibe è un farmaco ben tollerato, la cui azione sul trasportatore intestinale del colesterolo non interferisce con l'assorbimento dei trigliceridi, né di altre sostanze liposolubili come alcune vitamine.

Oltre ai principali effetti collaterali quali tosse, affaticamento, mal di schiena e diarrea, sono stati registrati alcuni casi rari di rabdomiolisi, epatite, pancreatite e trombocitopenia.

Viene spesso utilizzato in associazione alle statine, senza comportare un aumento dei casi avversi di miopatia e rabdomiolisi.

Dall'altro lato, un farmaco come l'ezetimibe non può essere utilizzato in associazione con determinate categorie di farmaci, che potrebbero alterarne la biodisponibilità.

Primi tra questi sono i sequestranti degli acidi biliari, che causano una riduzione dell'assorbimento del farmaco con conseguenza riduzione dell'effetto.

L'assunzione contemporanea con antiacidi contenenti alluminio e magnesio, riduce la C_{max} plasmatica del farmaco, al contrario della ciclosporina e dei fibrati (ad eccezione del fenofibrato) che sono in grado di aumentarla.[6]

L'assunzione di ezetimibe, al pari di quella delle statine, è controindicata sia durante la gravidanza che l'allattamento, e in generale nelle donne in età fertile, sempre per il ruolo fondamentale del colesterolo nel nostro organismo.[4]

3.2.4. Terapia

L'ezetimibe viene utilizzato normalmente in associazione con le statine, laddove loro non siano sufficienti ad abbassare i livelli plasmatici di LDL-C a valori nella norma.

Il suo utilizzo in monoterapia è raro e normalmente riguarda pazienti che non sono in grado di tollerare le statine. Le statine restano il gold-standard.

La terapia in associazione consente non solo un efficace riduzione dei livelli di LDL-C, ma permette al tempo stesso ai due farmaci di tamponare gli effetti farmacodinamici indesiderati generati dai reciproci meccanismi d'azione. Le statine consentono l'inibizione dell'aumento della

biosintesi di colesterolo indotta dal meccanismo d'azione dell'ezetimibe; lui d'altro canto inibisce l'aumento di assorbimento intestinale di colesterolo indotto dalle statine. [4]

È un ottimo regime terapeutico, molto utilizzato ed efficace. Infatti, come descritto precedentemente parlando delle statine, l'utilizzo di ezetimibe insieme a statine a media intensità ha dato risultati simili a quelli ottenuti da monoterapia con statina ad alta intensità. Addirittura, il primo regime terapeutico è risultato essere preferibile per evitare eventuali interruzioni del trattamento o riduzioni della dose.[17]

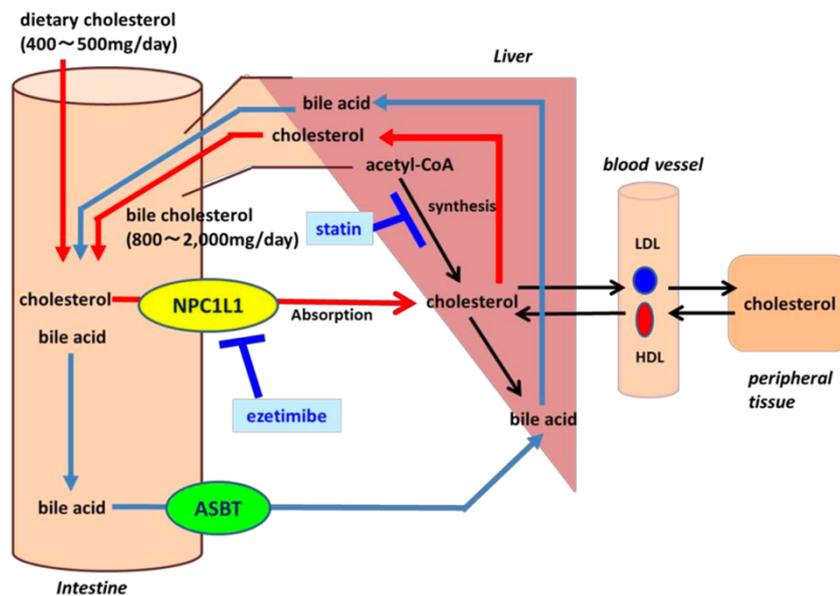


Figura 16. Rappresentazione degli eventi interni al nostro organismo durante l'assunzione della terapia in associazione di ezetimibe e statine. [20]

Lo studio PRECISE-IVUS del 2015, ha valutato l'efficacia della terapia in associazione, nella regressione delle placche nelle arterie coronarie in pazienti giapponesi, sottoposti ad angioplastica coronaria.

Lo studio ha messo a confronto pazienti trattati con l'associazione di ezetimibe (10 mg) e atorvastatina ad alta intensità, con quelli in monoterapia con l'atorvastatina ad alta intensità.

I pazienti sono stati confrontati all'inizio dello studio e poi al follow-up dopo 9-12 mesi.

Il dato principale che si può evincere dallo studio riguarda la riduzione di LDL-C, significativamente maggiore nei pazienti che assumevano la terapia di associazione.

Sempre nel gruppo studiato, data l'assunzione dell'ezetimibe, al follow-up risultavano essere ridotti significativamente anche i marker dell'assorbimento del colesterolo (latosterolo, campesterolo, sitosterolo), al contrario dei pazienti del gruppo controllo: nel loro caso campesterolo e sitosterolo risultavano aumentare, seppur di poco, a causa della terapia con sola statina, che promuove un aumento dell'assorbimento intestinale di colesterolo e fitosteroli.

L'analisi dell'IVUS (Intravascular Ultrasound) ha permesso di valutare la progressione della placca in un segmento scelto di coronaria, valutato all'inizio dello studio e poi al follow-up.

La riduzione percentuale del volume della placca è risultata statisticamente significativa tra i pazienti in terapia di associazione al follow-up rispetto alla loro stessa baseline.

Anche nei pazienti in monoterapia c'è stata una regressione del volume percentuale della placca, ma non significativa.

L'outcome dello studio fa capire che, effettivamente, la riduzione percentuale del volume dell'ateroma è significativamente superiore ($p < 0.001$) nei pazienti che assumono ezetimibe e atorvastatina e, in particolare, il trattamento con ezetimibe e atorvastatina è non-inferiore, rispetto a quello con atorvastatina da sola, poiché la differenza media dell'effetto di riduzione percentuale tra i due farmaci, resta al di sotto del margine di non inferiorità del 3%, ma l'IC è di $(-3.079 - 0.003)$.

Inoltre, la percentuale di pazienti che ha manifestato regressione della placca è superiore nei pazienti che assumevano anche ezetimibe, rispetto a quelli in monoterapia (78% contro il 58% con un $p = 0.004$).

Inoltre, stratificando i pazienti dello studio tra quelli con sindrome coronarica acuta (ACS) e quelli con angina pectoris stabile (SAP), è emerso che la riduzione percentuale dell'ateroma è, in entrambi i regimi terapeutici, significativamente superiore nei pazienti con ACS.

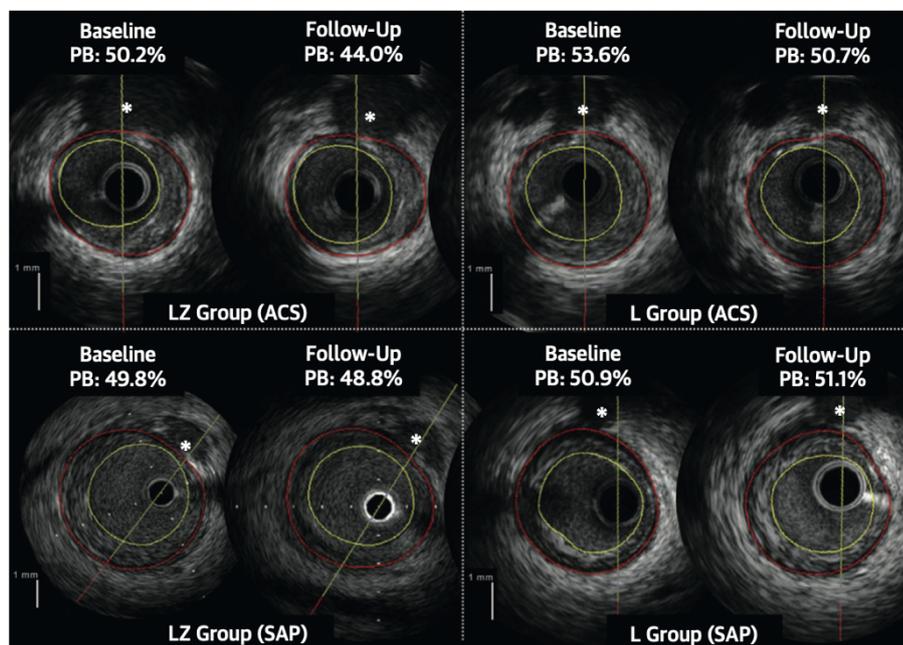


Figura 17. Immagini ottenute grazie all'IVUS. È possibile notare come la differenza nella regressione percentuale della placca sia superiore nei pazienti con ACS, rispetto a quelli con SAP.[21]

I risultati dello studio consentono di considerare, come precedentemente appurato da altri studi, l'associazione di statina ed ezetimibe come un'associazione vincente, per i motivi trattati in precedenza.

Questo studio in particolare ha dimostrato una correlazione tra la regressione della placca aterosclerotica e il raggiungimento di determinati valori plasmatici di LDL-C, che devono essere attorno ai 75 mg/dL affinché si verifichi la regressione.

Per questo risulta essere di fondamentale importanza raggiungere una riduzione stabilita del colesterolo LDL, altrimenti si rischia di trattare il paziente con la terapia base, di statine ad alta intensità, senza magari ottenere risultati positivi nella riduzione del rischio di malattia aterosclerotica.[21]

3.3. Sequestranti degli acidi biliari

Il primo utilizzo di questi medicinali risale al 1960, quando sono stati impiegati per la prima volta nel trattamento dei sintomi della colestasi. A causa dell'ostruzione dei dotti biliari questi pazienti erano soggetti ad accumulo di acidi biliari a livello cutaneo, con conseguente prurito e colorazione itterica.

Il farmaco utilizzato in questo caso era la colestiramina, impiegata ancora oggi nel trattamento sintomatico della colestasi e il cui utilizzo si è esteso al trattamento dell'ipercolesterolemia.[6]

I principi attivi attualmente disponibili in commercio sono: colestiramina, colestipolo e colesevelam.

Sono delle resine, quindi delle molecole altamente insolubili in acqua ad alto peso molecolare. Nonostante la struttura molecolare sia caratteristica di ognuno di questi tre farmaci, l'aspetto fondamentale che li accomuna è la presenza di gruppi funzionali con carica positiva, basici o quaternari. Tale aspetto è fondamentale per consentire il meccanismo d'azione mediante legame con gli acidi biliari.

Nonostante la presenza di numerose cariche positive, il legame con gli acidi non è l'unico che interessa i sequestranti degli acidi biliari, che sono anche in grado di legare molecole basiche come il propranololo e vitamine liposolubili non cariche, come la K, A, D ed E.

I gruppi ammoniacali quaternari sono caratteristici della colestiramina, la resina a peso molecolare maggiore, e del colesevelam; i gruppi amminici, secondari o terziari, sono tipiche del colestipolo e nuovamente del colesevelam.

Tutte queste caratteristiche portano ad una pKa compresa tra 9 e 10.5 che rende possibile la prevalenza della forma ionizzata attiva a livello intestinale.[6]

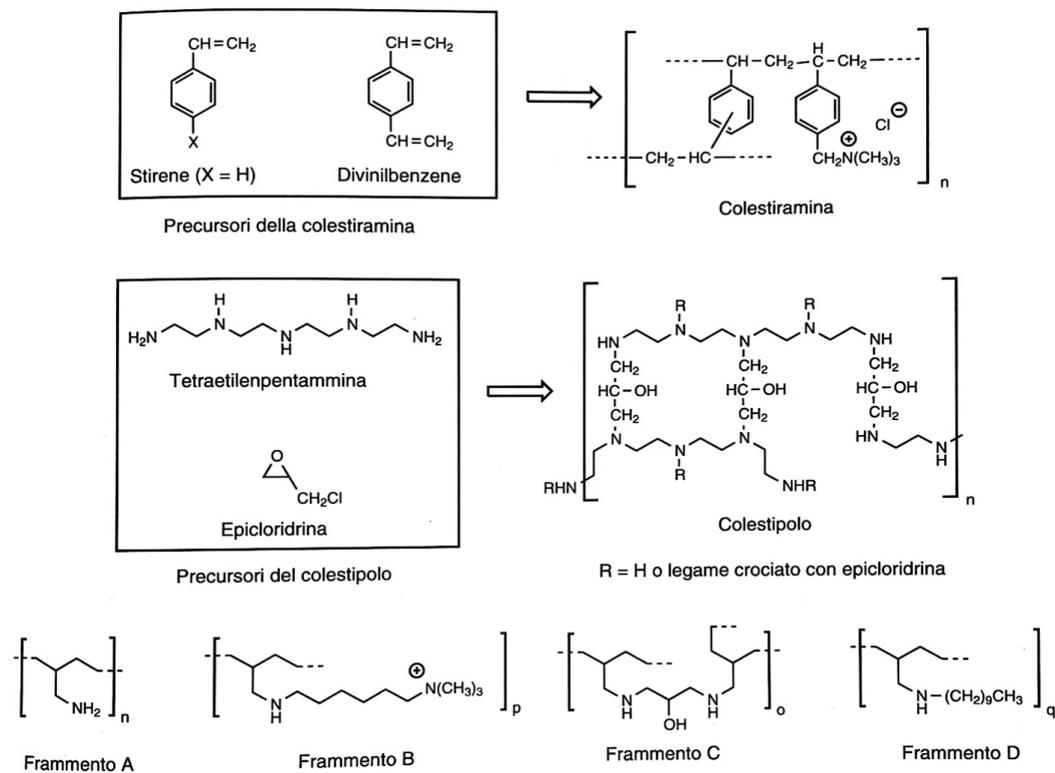


Figura 18. Struttura chimica di colestiramina e colestipolo e dei rispettivi precursori. La colestiramina presenta gruppi ammonici quaternari, mentre il colestipolo ammine secondarie e terziarie. Per il colesevelam sono riportati i gruppi funzionali che possono essere sia amminici che ammonici quaternari. [6]

3.3.1. Meccanismo d'azione

Questa classe di farmaci viene utilizzata in terapia per la sua capacità di ridurre la concentrazione plasmatica delle LDL-C. Nonostante ciò, al contrario delle terapie viste in precedenza, non presenta un bersaglio molecolare a livello cellulare.

Vengono somministrati per via orale e hanno azione locale: il loro "sito d'azione" sono i gruppi funzionali carichi negativamente presenti sugli acidi biliari, in particolare sull'acido glicocolico e sull'acido taurocolico.

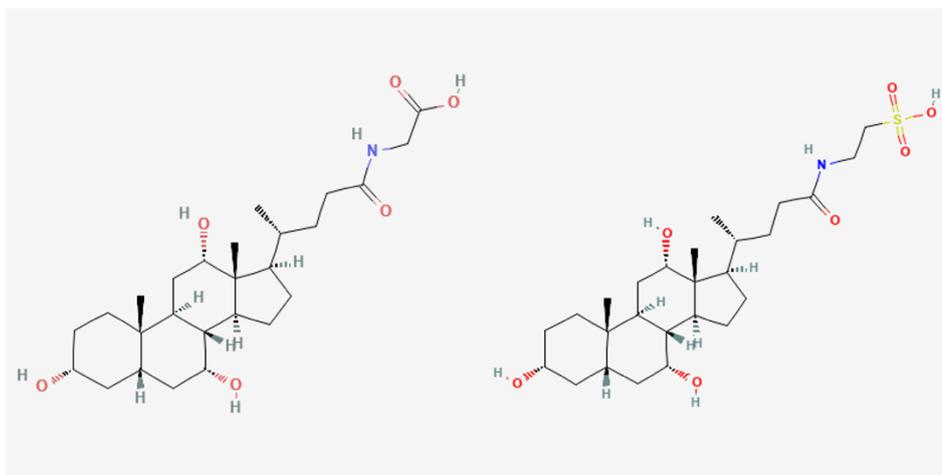


Figura 19. Strutture chimiche di due acidi biliari legati dalle resine: acido glicocolico e acido taurocolico. [87], [88]

Sono quindi delle resine in grado di sequestrare gli acidi biliari: l'obiettivo finale è quello di legarli ed evitarne il riassorbimento che, normalmente, porterebbe al ricircolo del 95% circa degli acidi biliari escreti a livello intestinale con la bile.

Infatti, gli acidi biliari vengono riassorbiti a livello intestinale raggiungendo poi il fegato, dove la loro presenza consente l'inibizione a *feedback* negativo dell'enzima 7α -idrossilasi. Questo enzima ha un ruolo fondamentale nella degradazione del colesterolo: catalizza il primo step della conversione del colesterolo ad acidi biliari. [6]

Nel momento in cui le resine espletano la loro azione e gli acidi biliari non tornano a livello epatico, il Farnesoid X Receptor (FXR), un fattore di trascrizione nucleare, viene disattivato e conseguentemente non è più in grado di sopprimere la trascrizione della 7α -idrossilasi, che è libera di portare avanti la via sintetica.

Come effetto principale delle resine il colesterolo viene quindi degradato per dare vita agli acidi biliari.[22]

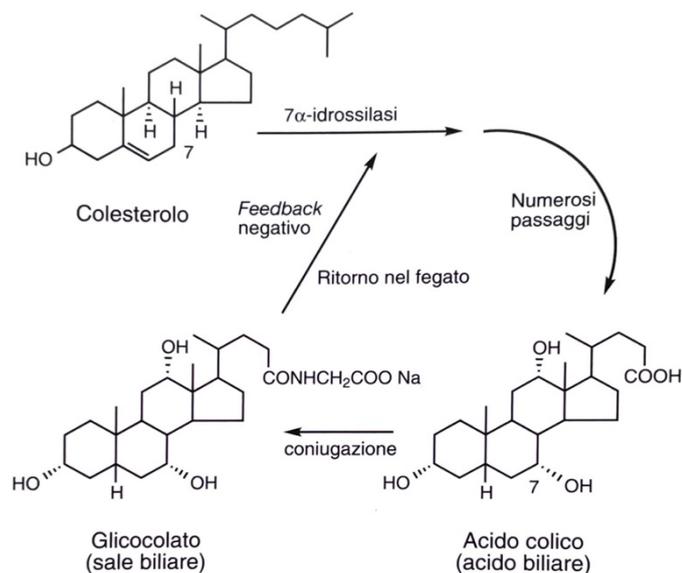


Figura 20. Meccanismo inibitorio della degradazione del colesterolo. L'acido colico viene trasformato in sale sodico per coniugazione con il sodio glicinato, dando vita al glicocolato. Il glicocolato viene riassorbito e riportato a livello epatico, dove esercita un meccanismo a feedback negativo che vede l'inibizione della trascrizione della 7α-idrossilasi, bloccando così la degradazione del colesterolo e dunque la sintesi di ulteriori acidi biliari. [6]

Il meccanismo delle resine porta quindi all'attivazione indiretta di meccanismi secondari, come nel caso degli altri farmaci con azione sul colesterolo.

In particolare, si avrà un aumento dell'espressione dei recettori per le LDL a livello epatico, per poter sostenere la sintesi degli acidi biliari, con conseguente riduzione dei livelli plasmatici di LDL-C.

D'altro canto, l'azione delle resine porta anche ad un'augmentata biosintesi del colesterolo per induzione dell'enzima HMG-CoA reduttasi, che non inficia però in modo gravoso sull'effetto finale delle resine.[4]

Dunque, nonostante dispongano di un meccanismo d'azione completamente diverso rispetto ai precedenti, è possibile trovare dei punti in comune nei meccanismi indiretti che attivano.

Ecco perché l'eventuale utilizzo delle resine in combinazione con le statine può essere preso in considerazione per aumentare l'efficacia delle prime, contrastando con le seconde l'effetto induttivo sull'HMG-CoA reduttasi.

Altra considerazione importante è l'effetto delle resine a scambio ionico sui livelli di trigliceridi e di HDL. Le HDL non subiscono aumenti significativi dall'utilizzo di questa terapia, mentre i livelli plasmatici di trigliceridi tendono ad aumentare a causa dell'induzione della loro sintesi epatica dovuta al ridotto riassorbimento degli acidi biliari.

Quindi, in pazienti con eventuale ipertrigliceridemia e con livelli basali di trigliceridi superiori ai 250 mg/dL, l'utilizzo delle resine non è consigliato.

Delle tre resine attualmente in commercio, il colesvelam sembrerebbe non avere questo effetto, anche se ulteriori studi sono necessari. Dunque, il suo utilizzo in pazienti con ipertrigliceridemia è ancora associato a controlli settimanali dei livelli plasmatici di trigliceridi.[4]

3.3.2. Farmacocinetica

Sono molecole somministrate per via orale che non vengono assorbite a livello sistemico. La loro azione a livello locale ne consente un alto profilo di sicurezza e tollerabilità, nonostante l'induzione di effetti avversi a livello gastrointestinale.

Non vengono biotrasformate dagli enzimi gastrointestinali: dopo aver svolto la loro azione vengono eliminate immutate nelle feci insieme agli acidi biliari che hanno sequestrato.

Il loro effetto sui livelli di LDL-C è apprezzabile nel giro di uno o due giorni, e resta comunque un effetto dose dipendente. Le dosi minime di colestiramina (8-12g) e colestipolo (10-15 g) portano a una riduzione delle LDL-C plasmatiche dal 12 al 18%. Invece, ai rispettivi massimi dosaggi, i livelli di LDL-C si riducono anche del 25%, portando però ad effetti gastrointestinali indesiderati.

La terapia con colesvelam raggiunge una riduzione massima di LDL-C del 18%.

L'effetto massimo delle resine è comunque riscontrabile in seguito ad almeno un mese di terapia ed è quindi opportuno attendere tale periodo prima di valutare terapie alternative.[4]

3.3.3. Effetti Avversi

La loro sicurezza a livello sistemico è già nota, essendo farmaci con azione locale a livello del tratto GI. Per quanto riguarda gli effetti indesiderati in situ, i principali sono abbastanza comuni, come gonfiore, dispepsia ed eventualmente stipsi, a causa dell'aumento della consistenza delle feci. Sono eventi che possono essere attenuati o addirittura eliminati mettendo in atto semplici accorgimenti.

Per quanto riguarda il gonfiore, bisogna sospendere la forma farmaceutica, polvere o granulato che sia, nell'acqua o in un succo qualche ora prima dell'assunzione, per essere sicuri di ottenere una sospensione omogenea. In effetti, gli RCP dei medicinali autorizzati indicano di attendere almeno dieci minuti dopo la sospensione della polvere prima di assumere il farmaco.

Per quanto riguarda la stipsi, è importante accompagnare la terapia con le resine ad un adeguato introito di acqua e fibre e, se necessario, utilizzare anche integratori a base di psillio o altri lassativi.[6]

Purtroppo, l'aspetto più problematico di questa classe di farmaci riguarda l'interazione con l'assorbimento di altri medicinali assunti per via orale.

Le interazioni di colestiramina e colestipolo sono molte, le più pericolose riguardano il warfarin, la furosemide, il propranololo, l'L-tiroxina e alcune statine.

Al contrario il colesevelam non sembra interagire con tali principi attivi, ma con il verapamil.

Il consiglio e la modalità d'uso che viene impartita dal medico e suggerita dal farmacista consiste nell'evitare l'assunzione di altri farmaci nelle 4 ore successive all'assunzione della resina oppure, se necessario, assumere tali farmaci almeno un'ora prima delle resine stesse.[4]

È fondamentale che il medico e il farmacista istruiscano il paziente riguardo queste modalità d'utilizzo, a maggior ragione in pazienti che assumono questi farmaci per dislipidemie che, con alta probabilità, sono contemporaneamente trattati con farmaci per patologie cardiovascolari come quelli citati sopra.

3.3.4. Terapia

L'utilizzo delle resine in terapia è ben noto e gli studi che sono stati fatti riguardo la loro efficacia risalgono prevalentemente al periodo tra gli anni '60 e '00.

In uno studio del 2004 è stato valutato il regime di associazione tra resina e statine, associando nello specifico la colestiramina a bassi dosaggi (16 g/die) alla rosuvastatina (80 mg/die).

Prima della randomizzazione tutti i pazienti dello studio hanno dovuto seguire un regime dietetico della durata di sei settimane, seguito da una terapia comune con rosuvastatina 40 mg/die per altre sei settimane. A quel punto, sono stati divisi in due gruppi, uno in monoterapia con rosuvastatina 80 mg/die e l'altro con la terapia in combinazione.

Alla fine del trial è stato possibile definire l'assenza di differenze statisticamente significative nella riduzione delle LDL-C tra i due gruppi e quindi, l'assenza di effetti di importanza statistica riguardo l'aggiunta della resina in terapia.

In realtà, a seguito della randomizzazione vi è stata differenza tra i due gruppi nella riduzione dei livelli plasmatici di LDL-C, ma questa non è stata significativa: -4.2% IC (-8.8 +/- 0.5) con un p-value di 0.08.

Questi risultati e questo articolo ci consentono però di mettere in luce un aspetto fondamentale di questi farmaci: la loro forma farmaceutica, ovvero una polvere da sospendere in acqua, insieme

agli effetti gastrointestinali, non garantiscono un'alta compliance da parte dei pazienti. È stato infatti stimato che il 49% dei partecipanti in terapia di combinazione non ha assunto la resina in modo costante.

Dunque, non va sottovalutato il rapporto del paziente con la terapia che deve assumere.

Inoltre, non è da escludere che, in pazienti complianti, la terapia di combinazione possa effettivamente portare a differenze statisticamente significative nella riduzione delle LDL-C rispetto alla monoterapia con le statine, tenendo conto che in questo studio è stato utilizzato un dosaggio di rosuvastatina molto elevato, non attualmente utilizzato, in quanto il massimo giornaliero utilizzato in terapia è di 40 mg, con i quali rientra già tra le statine ad alta intensità.[23]

Per quanto riguarda l'effetto di una terapia con le resine sulla progressione delle placche aterosclerotiche, uno studio del 2010 ha valutato tale impatto, confrontando pazienti trattati con colestiramina (8g/die) e sitosterolo, atorvastatina 10 mg/die e atorvastatina 80 mg/die.

In realtà, i risultati sono facilmente deducibili da quanto già studiato, ma consentono di guardare le terapie da un nuovo punto di vista.

Tale studio, infatti, si è focalizzato non solo sulla valutazione della riduzione delle LDL-C nelle tre diverse terapie, ma anche su quella dei marker infiammatori e sull'effetto delle diverse terapie riguardo la modulazione del fenotipo delle placche.

Tutti i soggetti in studio erano pazienti con ipercolesterolemia e in lista per endoarterectomia carotidea, intervento durante il quale la placca aterosclerotica formatasi nella carotide viene asportata chirurgicamente.

All'inizio dello studio mancavano tre mesi alla chirurgia, estremamente delicata. È stato possibile valutare l'utilità di questi farmaci nel garantire una maggiore stabilità delle placche in attesa dell'intervento.

L'assunzione dell'atorvastatina 80 mg/die e dell'atorvastatina 10 mg/die ha consentito una riduzione maggiore (-1.50 e -1.30 vs -0.39 mmol/L) e statisticamente significativa delle LDL-C rispetto all'assunzione della colestiramina insieme al sitosterolo.

Inoltre, è stato possibile valutare al microscopio la diversa presenza di macrofagi, linfociti e cellule muscolari lisce a livello della placca nei tre regimi terapeutici.

I macrofagi comportano la produzione di ROS e metalloproteasi, che sono in grado di ridurre l'integrità del cappuccio fibroso, favorendo la rottura della placca. La riduzione della loro presenza è quindi un risultato auspicabile da queste terapie. Dallo studio è stato possibile evincere una differenza statisticamente significativa tra atorvastatina 80 mg/die e colestiramina con sitosterolo, ma anche tra atorvastatina 10 mg/die e colestiramina con sitosterolo.

In particolare, l'assunzione di atorvastatina 80 mg/die, al contrario di atorvastatina 10 mg/die e della colestiramina con sitosterolo, ha indotto un aumento di cellule muscolari lisce a livello della placca, indice positivo di aumento della resistenza della placca.

Nel momento in cui tali risultati sono stati aggiustati in base ai livelli di LDL-C ottenuti al follow up, è rimasta statisticamente significativa la differenza nella riduzione di macrofagi a livello della placca nei pazienti in terapia con atorvastatina 80 mg/die. Questo ha portato a dedurre che la riduzione del numero di macrofagi non sia un effetto diretto delle statine, ma sia conseguente e dipendente (anche in termini di entità della riduzione del numero di macrofagi) alla riduzione dei livelli plasmatici di LDL-C. [24]

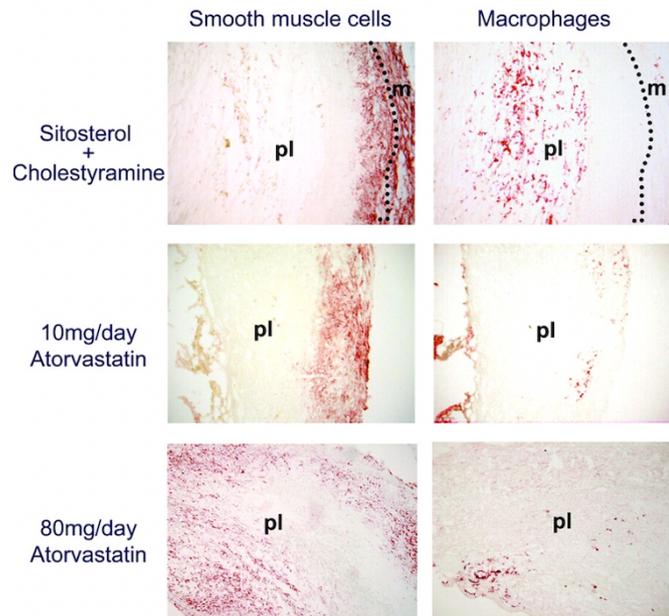


Figura 21. Esiti di indagine immunocitochimica sul fenotipo delle placche aterosclerotiche dopo tre mesi con i tre diversi regimi terapeutici. Il limite tra la placca e la tonaca media, quando presente, è definito dalla linea tratteggiata; l'ingrandimento è 100x. [24]

Questo studio non ha dimostrato vantaggi nell'utilizzo della colestiramina al posto delle statine, riportando l'attenzione sul suo utilizzo in associazione alle stesse.

Al tempo stesso però, ci consente di dimostrare nuovamente l'importanza delle statine nel trattamento dell'ipercolesterolemia e dell'aterosclerosi e di come la terapia farmacologica sia importante nell'accompagnamento del paziente a un intervento chirurgico in alcuni casi inevitabile.

Uno studio sul colestipolo in pazienti adolescenti con ipercolesterolemia familiare ha dimostrato, oltre a una riduzione statisticamente significativa dei livelli di LDL-C e di Apolipoproteina B nel gruppo trattato rispetto al placebo, l'importante impatto che le resine presentano nei confronti dell'assorbimento dei nutrienti liposolubili.

Dopo un anno di terapia i livelli sierici di folati, carotenoidi e vitamina E si sono abbassati, lo stesso è successo per la vitamina D. Questo per ricordare l'importanza di assumere farmaci e pasti

lontani dai sequestranti degli acidi biliari, eventualmente accompagnando la terapia ad integratori specifici.[25]

In uno studio del 2020 sul colesevelam, sono stati messi insieme diversi dati di diversi clinical trial, per valutare l'efficacia della resina in pazienti adulti e pediatrici con ipercolesterolemia familiare eterozigote.

Lo studio in soggetti adulti vedeva un gruppo in terapia con colesevelam (3.75 g/die) e un gruppo placebo, entrambi trattati con statine ed ezetimibe.

La terapia di tripla combinazione ha portato a delle differenze statisticamente significative rispetto a quella senza colesevelam, in merito alla riduzione del colesterolo totale, del LDL-C, ma anche della Apolipoproteina B e della Apolipoproteina A-1.

Il rapporto tra le ultime due era significativamente inferiore nel gruppo trattato con il colesevelam rispetto al gruppo placebo [26]: tale dato viene valutato come marker predittivo delle malattie cardiovascolari e una sua riduzione implica, come è stato infatti osservato, una diminuzione dei valori di ApoB, considerate aterogeniche o potenzialmente aterogeniche, ed un aumento dei valori di Apo A-1, che troviamo normalmente sulle HDL. [27]

Aspetto fondamentale è che, nei pazienti in terapia con la resina, sono stati riscontrati valori di trigliceridi significativamente più elevati rispetto al gruppo placebo.[26]

Nei pazienti pediatrici è stata fatta la stessa analisi senza l'ezetimibe e aggiungendo un gruppo con dosaggio di 1.875 g/die di colesevelam.

Nei pazienti in terapia con statine è stata evidenziata una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi in terapia con la resina e il gruppo placebo.

Nei pazienti in terapia solo con il colesevelam o con il placebo, la differenza è stata evidenziata solo per il gruppo che stava assumendo la resina al dosaggio più alto. [26]

Un punto di vista interessante citato dallo studio riguarda l'approccio dei genitori alla terapia dei figli. Nonostante i risultati migliori fossero raggiunti inevitabilmente con l'impiego della resina in associazione con le statine, la terapia con le resine è stata preferita nel trattamento dei bambini, in quanto non viene assorbita a livello sistemico e quindi è un approccio meno "invasivo".

Inoltre, la forma farmaceutica del colesevelam, ne consente la dispersione in acqua o in altra bevanda, come succhi di frutta, rendendone più semplice la somministrazione ai pazienti pediatrici e meno sofferta, al contrario di una compressa da deglutire.[26]

L'utilizzo delle resine in terapia è quindi importante nell'associazione e come approccio efficace e più tollerato. Sicuramente, non consentono da sole il raggiungimento di valori ottimali di LDL-C, soprattutto in pazienti con un quadro clinico grave. Gli studi riportati riguardano quasi sempre

un utilizzo in associazione e ribadiscono l'importanza di un regime dietetico appropriato, che è sempre presente negli stessi, prima dell'inizio della terapia farmacologica e poi contestualmente al trattamento.

L'efficacia delle resine in terapia è dipendente dalla dose somministrata e quindi nei casi più gravi è indicato l'utilizzo di dosaggi elevati di questi farmaci, tenendo a mente che, nonostante non vengano assorbiti, possono causare effetti collaterali a livello gastrointestinale.

3.4. Plasmaferesi extracorporea

La plasmaferesi extracorporea è una tecnica di purificazione del sangue utilizzata in diverse patologie, con lo scopo di rimuovere molecole indesiderate dal torrente circolatorio.

In questo caso, viene utilizzata con l'obiettivo di rimuovere dal plasma le lipoproteine in eccesso, in particolare le LDL, la Lp-a e le VLDL: quando viene utilizzata in queste condizioni, è definita come aferesi lipoproteica.[28]

L'aferesi lipoproteica è una tecnica invasiva, paragonabile alla dialisi renale, che viene utilizzata esclusivamente quando necessario, ovvero in pazienti gravi, come quelli con ipercolesterolemia familiare omozigote.

Questa malattia genetica comporta livelli di colesterolo estremamente superiori rispetto al resto della popolazione, rendendo la terapia con le statine spesso l'unica alternativa farmacologica efficace nelle loro condizioni. In alcuni casi però, anche questi pazienti sono intolleranti o non responsivi agli inibitori della HMG-CoA reduttasi, rendendo necessario un intervento fisico e non più farmacologico.

3.4.1. Tecniche di aferesi lipoproteica

Il primo tentativo di aferesi lipoproteica è stato effettuato da Gilber Thompson et al. e consisteva nello scambiare il plasma del paziente con un volume equivalente di plasma privo di colesterolo. Al giorno d'oggi invece, si effettua una pulizia del sangue selettiva nei confronti dell'LDL-C, grazie alla messa a punto di un buon numero di tecniche cliniche utili a rendere tutto ciò possibile.

La prima tecnica di aferesi prevede l'utilizzo del destrano solfato (DSA). Legando covalentemente il destrano solfato a delle sfere di cellulosa, questo diventa in grado di legarsi alle LDL e alle VLDL in modo altamente selettivo. L'aspetto positivo è che tale affinità di legame non sussiste per le HDL, che non vengono toccate.

Un tempo era necessario separare in primo luogo il plasma dal resto del sangue per mettere in pratica questa tecnica, ma al giorno d'oggi questo step iniziale non è più necessario.

La seconda tecnica è la HELP, Precipitazione Extracorporea delle LDL con Eparina.

Rispetto alla precedente la tecnica prevede la separazione del plasma dal sangue e la successiva aggiunta di eparina al plasma.

L'eparina è in grado di far precipitare le LDL, che vengono poi filtrate direttamente dal plasma.

Il plasma viene poi necessariamente purificato dall'eparina, e si ripristina il pH fisiologico, evitando eventuali effetti avversi a carattere emorragico.

La plasmaferesi per filtrazione è stata una delle prime ad essere utilizzate. Il sangue viene centrifugato, ottenendo la separazione delle sue componenti in base a densità e peso molecolare. Non è una tecnica innovativa e richiede l'utilizzo di anticoagulanti con citrati, rappresentando un rischio di ipocalcemia. Inoltre, un altro rischio è la trombocitopenia.

Per eseguire questa tecnica oggi si utilizza la plasmaferesi con doppia filtrazione (DFPP). Il sangue viene fatto passare attraverso due filtri diversi: il primo separa il plasma, mentre il secondo separa le molecole ad alto peso molecolare.

La PFBA (Polyacrylate Full Blood Adsorption) è stata la prima tecnica per l'aferesi lipoproteica a consentire la rimozione delle LDL direttamente dal sangue come tale, senza bisogno di separare prima il plasma. D'altro canto, la filtrazione del sangue per intero ha causato effetti collaterali quali ipercalcemia e ipotensione posturale.

Per eseguire l'aferesi lipoproteica si possono utilizzare anche degli anticorpi monoclonali, selettivi nei confronti delle ApoB, componenti principali delle LDL ma anche delle VLDL.

In questo caso la tecnica viene chiamata "Immunoassorbimento", e vede l'utilizzo di anticorpi policlonali di pecora indirizzati verso l'ApoB100.

Questi anticorpi sono stati poi ritrovati a livello plasmatico nei pazienti trattati, senza alcuna manifestazione di effetti collaterali. [29]

3.4.2. Campo di applicazione dell'aferesi lipoproteica

Non tutte queste tecniche sono state approvate in terapia. La prima ad aver ottenuto l'approvazione da parte dell'FDA è stata la DSA, nel 1997. L'anno successivo è stata approvata anche la tecnica HELP.

L'utilizzo di queste tecniche è approvato negli USA solo per alcuni tipi di pazienti, che devono rientrare in una delle seguenti categorie:

Se pazienti con ipercolesterolemia familiare omozigote, devono avere livelli di LDL-C superiori a 500 mg/dL

Se pazienti con ipercolesterolemia familiare eterozigote, senza malattia coronarica (CAD), devono avere livelli di LDL-C superiori a 500 mg/dL

Se pazienti con ipercolesterolemia familiare eterozigote e con malattia coronarica (CAD), devono avere livelli di LDL-C superiori a 200 mg/dL

Inoltre, per poter accedere alla terapia, i pazienti devono essere stati non responsivi alla terapia a massimo dosaggio con almeno due classi di farmaci in contemporanea, per almeno sei mesi. [29]

3.4.3. Trattamento

L'utilizzo di questa terapia è quindi valutabile solo in pazienti con quadri clinici estremamente gravi.

Non è una terapia curativa, soprattutto nei confronti di una patologia di natura genetica, ma è un approccio clinico necessario per tenere pulite le arterie del paziente ed evitare ulteriori complicazioni come la formazione di placche aterosclerotiche, a cui questi pazienti sono ovviamente inclini.

Il paziente viene trattato settimanalmente o ogni due settimane, in base alle esigenze, con un ciclo che va dall'ora e mezza fino alle quattro ore.[30]

In seguito a un ciclo di aferesi lipoproteica, i valori di LDL-C, di Lp-A e VLDL, si riducono in modo netto nel plasma, per poi risalire fino al ciclo successivo.

Quindi, per un paziente in terapia, la concentrazione massima di questi componenti è considerata come la concentrazione che il paziente ha immediatamente prima l'aferesi successiva. Mentre la concentrazione di base è la concentrazione massima plasmatica di questi elementi prima di iniziare il primo ciclo di aferesi, che potrebbe anche essere influenzata dall'assunzione di farmaci. Bisogna tenere presente che l'effetto rebound tra un ciclo di aferesi e l'altro è inevitabile. [29]

L'effetto rebound è dovuto ad un'alterazione dell'equilibrio tra catabolismo e sintesi del colesterolo e consiste in un aumento repentino dei livelli plasmatici di lipoproteine in seguito al ciclo di aferesi.[31]

Infatti, la sintesi delle LDL segue una cinetica di ordine zero, restando costante nel tempo indipendentemente dalla nuova concentrazione plasmatica delle LDL in seguito ad aferesi. Invece, il catabolismo delle LDL non resta costante ma aumenta in seguito all'aumento della concentrazione delle LDL, seguendo una cinetica di primo ordine.

Di conseguenza, in seguito all'effetto di riduzione delle lipoproteine dell'aferesi lipoproteica, i livelli di lipoproteine aumentano nel sangue seguendo un andamento curvilineo, per raggiungere poi un andamento asintotico fino al successivo ciclo di aferesi. [31]

Logicamente, in pazienti sani l'effetto rebound raggiunge il successivo steady state molto velocemente rispetto ai pazienti affetti da HeFH e HoFH.

FCR è il tasso catabolico frazionato e permette di valutare la velocità del catabolismo, in questo caso delle LDL.

Un paziente sano presenta un FCR (Fractional Catabolic Rate) delle LDL pari a 0,5 pools/day. I pazienti con HeFH 0,25 pools/day e in quelli con HoFH 0,125 pools/day.

La differenza dei pazienti malati rispetto ai pazienti sani e tra di loro è legata alla deficienza di recettori per le LDL nell'ipercolesterolemia familiare. I soggetti omozigoti hanno infatti la FCR più bassa di tutti e di conseguenza i livelli plasmatici di LDL più elevati. [32]

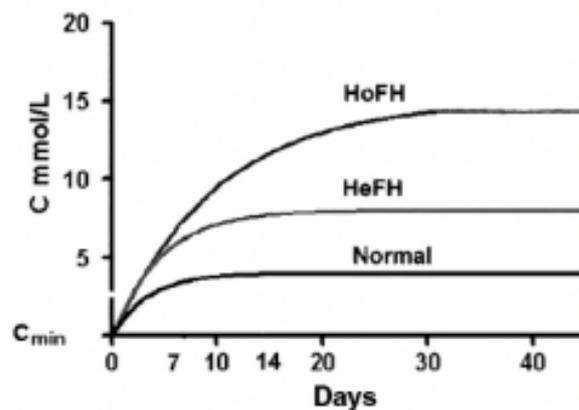


Figura 22. Diverso impatto dell'effetto rebound in pazienti sani o con ipercolesterolemia familiare eterozigote o omozigote. [32]

In uno studio del 2010, è stata notata una riduzione del 72% delle LDL-C in pazienti con FH (Familial Hypercholesterolemia) omozigote, rispetto al trattamento farmacologico.

Purtroppo, tale risultato non è accompagnato dalla riduzione delle dimensioni delle placche aterosclerotiche, anzi in alcuni casi se ne sono formate delle nuove.

In generale però, l'incidenza degli eventi cardiovascolari si riduceva da 7.02% a 1.17% per persona ogni anno, dimostrando come la plasmaferesi sia utile nel ridurre il rischio di infarto o di malattia coronarica nei pazienti. [33]

Il ruolo dell'aferesi lipoproteica è molto importante nei pazienti con FH, in particolare anche per le donne in gravidanza che dovessero soffrire di questa patologia.

Alcuni effetti del trattamento, oltre alla riduzione delle lipoproteine plasmatiche, riguardano una riduzione dei marker infiammatori come la proteina C-reattiva, una riduzione dei fattori della coagulazione e di proteine fibrinolitiche e la riduzione dei livelli della PCSK9, proteina fondamentale nella la degradazione del recettore delle LDL e soggetto di studio nel prossimo capitolo insieme ai farmaci in grado di inibirla.[30]

Purtroppo, a causa della gravità della patologia dei pazienti trattati con l'aferesi lipoproteica e dell'assenza di trattamenti paragonabili, non sono presenti studi RCT in grado di confrontare un gruppo in terapia verso un gruppo trattato con placebo perché non etico. Gli studi a cui possiamo fare riferimento dimostrano comunque l'importanza dell'aferesi nella riduzione degli eventi cardiovascolari, come nel caso citato precedentemente.

In conclusione, con la scoperta di nuovi bersagli molecolari e la messa a punto di nuovi farmaci per il trattamento dell'ipercolesterolemia e quindi dell'aterosclerosi, è auspicabile che l'aferesi lipoproteica, per quanto efficace e tollerata, venga sostituita da terapie farmacologiche meno invasive, che consentano al paziente una qualità della vita migliore.

4. TERAPIE INNOVATIVE

In questo capitolo verranno indagati gli approcci terapeutici di più recente scoperta ed approvazione per la riduzione del colesterolo LDL e il trattamento dell'aterosclerosi.

Le terapie che verranno descritte rientrano nel panorama delle biotecnologie farmaceutiche e non solo.

4.1. Inibitori di PCSK9

Questa classe di farmaci è rappresentata da composti in grado di interagire con la proproteina della convertasi subtilisina/kexina di tipo 9, ovvero PCSK9, che è un enzima atto alla degradazione del recettore delle LDL (LDLR).

Sotto questo nome vengono inclusi tutti i farmaci che, in virtù della loro interazione con l'LDLR, sono in grado di bloccare l'azione di tale recettore indipendentemente dalla loro natura e dal loro meccanismo d'azione. [4]

Infatti, gli inibitori di PCSK9 sono attualmente di due tipi: il primo comprende anticorpi monoclonali in grado di legarsi a PCSK9 bloccandone l'azione; il secondo include dei siRNA che inibiscono la traduzione dell'mRNA codificante per PCSK9 con conseguente blocco della sua sintesi.[4]

4.1.1. Funzione, struttura e biosintesi di PCSK9

PCSK9 è una glicoproteina di 692 amminoacidi prodotta prevalentemente dal fegato per poi essere rilasciata a livello ematico. Il suo ruolo è quello di legare il recettore per le LDL che si trova sulla membrana degli epatociti, promuovendone l'internalizzazione e di conseguenza la degradazione ad opera dei lisosomi. [34]

Il suo meccanismo d'azione è stato compreso per la prima volta tra il 2004 e il 2005, da Maxwell e Breslow: i loro studi hanno dimostrato come l'espressione eccessiva di PCSK9 portasse ad una riduzione dell'LDLR per aumento della sua degradazione e non per riduzione della sua trascrizione.

Attraverso ulteriori studi si è giunti a comprendere la funzione di PCSK9, la cui presenza o assenza è di fondamentale importanza per l'omeostasi del colesterolo.[34]

Quando PCSK9 non è presente, LDLR lega le LDL circolanti formando un complesso che viene poi internalizzato per endocitosi dall'epatocita: all'interno dell'endosoma i due costituenti del complesso si dissociano con conseguente riciclo di LDLR e degradazione lisosomiale della lipoproteina. [4]

Quando PCSK9 è presente nel torrente circolatorio si lega al complesso LDL – LDLR e viene quindi internalizzata nell'epatocita. PCSK9 impedisce la dissociazione dei due componenti, portando alla degradazione lisosomiale di entrambi e impedendo quindi il riciclo del recettore di membrana. [4]

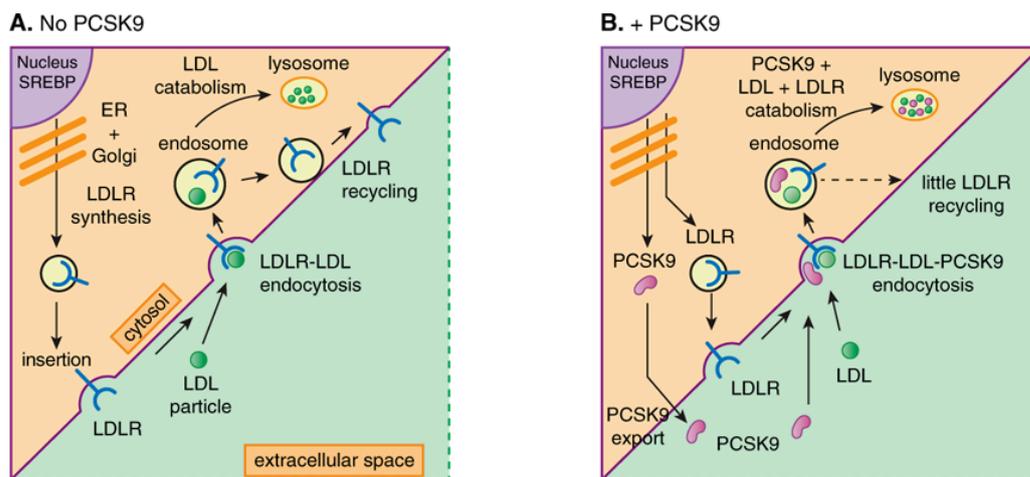


Figura 23. A. PCSK9 non viene sintetizzato: il recettore per le LDL viene espresso sia per biosintesi che per riciclo con aumentato uptake delle LDL; B. PCSK9 viene sintetizzato: la proteina viene rilasciata in circolo dove si lega all'LDLR causandone, in seguito ad endocitosi, la degradazione con conseguente riduzione dell'uptake di LDL. [4]

La struttura molecolare di PCSK9 è costituita da tre domini principali (prodominio, dominio catalitico e dominio C-terminale a cerniera ricco di Cis e His), ai quali è annesso un peptide segnale. La forma non matura dell'enzima viene definita pre-pro-PCSK9 e comprende tutti gli elementi appena descritti. [35]

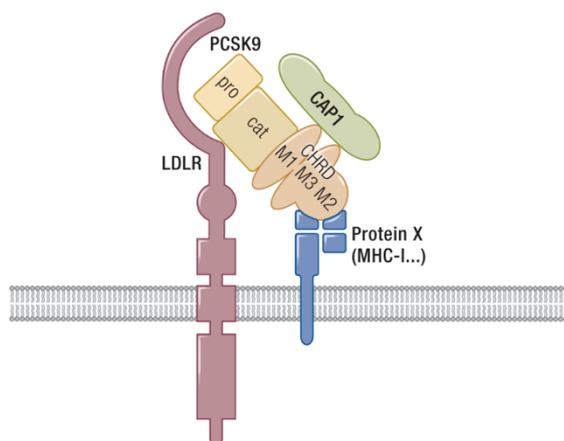


Figura 24. Struttura di PCSK9. Sono disegnati i tre domini principali: prodominio, dominio catalitico e dominio ricco di cisteine e istidine (CHRD). CAP1 si lega ai domini M1 e M3 interni a CHRD promuovendo l'azione della proteina. [34]

Il peptide segnale ha un ruolo fondamentale nell'indirizzare la pre-pro-PCSK9 verso il reticolo endoplasmatico (RE). Una volta raggiunto il RE il proenzima va incontro a scissione autocatalitica, che consente la rimozione del peptide segnale stesso con formazione della pro-PCSK9.[35]

A questo punto, anche il prodominio viene rimosso dalla proproteina per consentirle di uscire dal reticolo endoplasmatico: questo però non si stacca completamente, ma resta legato al dominio catalitico attraverso un legame a idrogeno per evitare che tale dominio interagisca con altri substrati cellulari. Mutazioni che comportano l'assenza del prodominio (mutazioni LOF, *loss of function mutations*) impediscono l'uscita della proPCSK9 dal RE e portano quindi ad una riduzione dei livelli plasmatici di LDL. In particolare, la mutazione LOF R46L è considerata una mutazione protettiva nei confronti delle malattie cardiovascolari.[35][34]

Una volta maturata e quindi secreta in circolo, il dominio catalitico è responsabile del legame con LDLR attraverso l'interazione con il sito del recettore che ha sequenza amminoacidica analoga a quella dell'EGF-A (Epidermal Growth Factor – A). Dopodiché, il complesso LDL-LDLR-PCSK9 viene internalizzato per endocitosi mediata da clatrina, portando alla degradazione del recettore e dell'enzima stesso, grazie al pH acido dell'endosoma che promuove la stabilità del legame enzima-recettore impedendone il riciclo. [35]

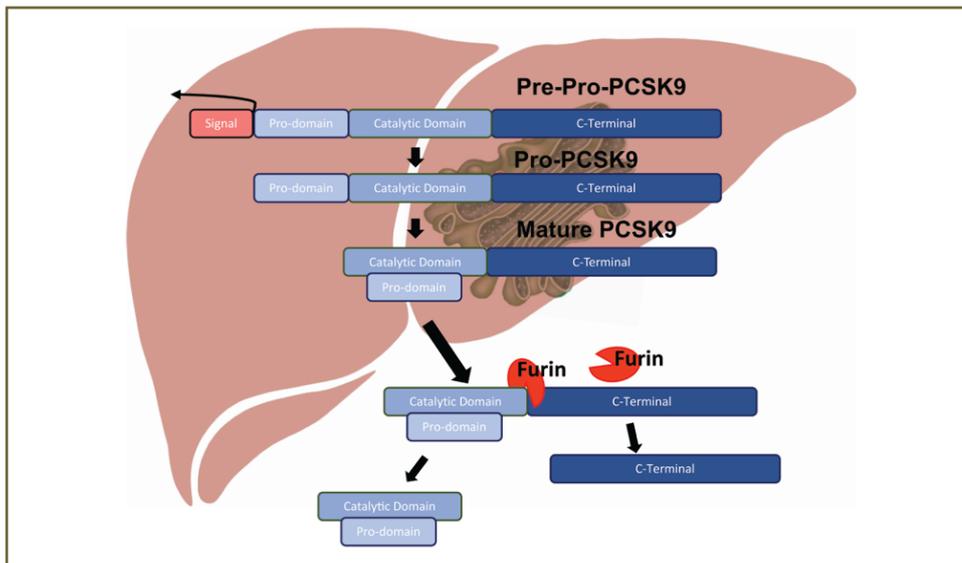


Figura 25. Step di maturazione da Pre-Pro-PCSK9 a PCSK9 matura. [35]

Quando la PCSK9 viene rilasciata a livello plasmatico può subire delle modifiche post-traduzionali, come quella messa in atto dalla furina, che taglia la PCSK9 dando vita a una proteina più piccola (55 kDa) e meno affine al recettore per le LDL. Un modo che l'enzima ha per difendersi da questo taglio è il legame alle LDL che le consente di preservare la sua integrità ed affinità per LDLR.[35]

Per quanto la quota principale di PCSK9 escreta sia di origine epatica, la sua sintesi avviene anche a livello cardiaco, pancreatico e cerebrale. Infatti, la sua scoperta è stata fatta proprio all'interno dei neuroni, dove viene chiamata NARC-1 (Neural Apoptosis Regulated Convertase -1) perché i suoi livelli aumentano in concomitanza con il processo di apoptosi.

Il ruolo di PCSK9 è stato studiato anche nella malattia di Alzheimer per la sua utilità nella clearance degli accumuli di β -Amiloide: è un aspetto molto importante da tenere in considerazione nello studio di questi farmaci per gli eventuali effetti collaterali a cui possono condurre con la loro inibizione dell'enzima, che verranno trattati nei prossimi paragrafi.[35]

4.1.2. Anticorpi monoclonali inibitori di PCSK9

La prima classe di farmaci studiata come inibitori di PCSK9 sono gli anticorpi monoclonali (mAb).

Questi mAb sono in grado di legarsi alle regioni M1 o M3 del dominio ricco di Cys e His di PCSK9 impedendogli di legarsi a LDLR, evitandone la degradazione. [34]

Impedendo l'azione di PCSK9 si verifica il riciclo del recettore per le LDL sulla superficie dell'epatocita che comporta un'aumentata captazione di LDL dal circolo sanguigno. [4]

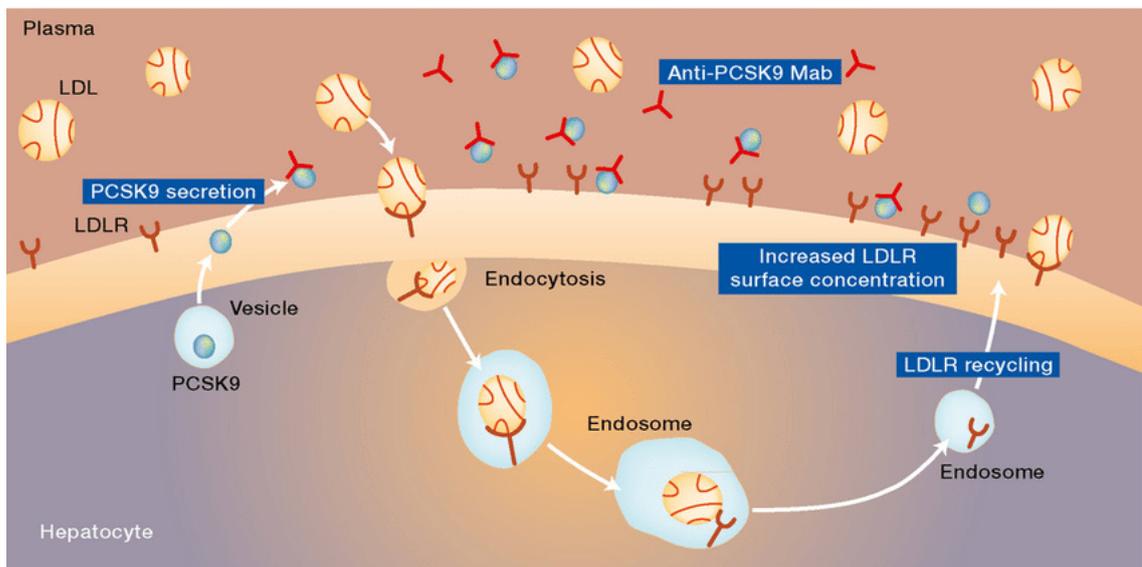


Figura 26. Meccanismo d'azione dei mAb inibitori di PCSK9. Sia evolocumab che alirocumab legano la PCSK9 matura, secreta nel plasma, impedendole di legarsi al LDLR. [89]

I mAb inibitori di PCSK9 attualmente approvati in terapia sono due, entrambi totalmente umani: alirocumab ed evolocumab.[4]

4.1.2.1. Alirocumab ed Evolocumab

I due anticorpi monoclonali sono stati approvati in terapia nel 2015, entrambi per il trattamento dell'ipercolesterolemia primaria, della dislipidemia mista e della malattia cardiovascolare aterosclerotica.

In particolare, sono stati approvati entrambi per l'ipercolesterolemia non familiare e familiare eterozigote, ma solo evolocumab per la familiare omozigote.

Il loro utilizzo deve essere accompagnato sempre da una dieta consona e può essere un trattamento in monoterapia o in associazione con altri ipolipemizzanti. [36], [37]

Il regime terapeutico più utilizzato è quello in associazione con le statine (alla dose massima tollerata) anche se, in alcuni pazienti, è necessario ricorrere all'utilizzo di altri farmaci ipolipemizzanti per l'eventuale intolleranza agli effetti collaterali indotti dalle statine, come già visto nel capitolo 3.

L'associazione può essere eventualmente estesa all'utilizzo di tutte e tre le tipologie di farmaci in contemporanea (mAb, statina ed un altro ipolipemizzante), laddove la doppia associazione non garantisca il raggiungimento dei valori plasmatici di LDL-C preposti.

In alternativa, può essere presa in considerazione la monoterapia con il solo mAb, nei casi in cui il paziente sia intollerante agli altri farmaci.[36], [37]

Nel momento in cui si utilizzano questi mAb in associazione con altre terapie ipolipemizzanti che aumentano, anche indirettamente, la concentrazione di PCSK9, bisogna tenere conto dell'alterata degradazione del mAb. Infatti, la clearance target-mediata dell'anticorpo aumenta del 20% nel caso di evolocumab insieme alle statine e del 40% per quanto riguarda alirocumab con le statine. Anche l'ezetimibe incide sulla clearance PCSK9 mediata di alirocumab, aumentandola del 15%.[36], [37]

Dagli RCP resi disponibili dall'AIFA la dose iniziale di alirocumab approvata in commercio è di 75 mg, che il paziente si può somministrare per via sottocutanea ogni due settimane.

Per pazienti che necessitano di una riduzione delle LDL-C maggiore del 60%, la dose indicata è di 150 mg ogni 2 settimane oppure 300 mg ogni 4 settimane.

La posologia massima, la più potente, è quella di 150 mg ogni 2 settimane.

Per quanto riguarda evolocumab, il dosaggio iniziale è di 140 mg ogni due settimane o 420 mg una volta al mese, con effetti clinicamente equivalenti.

Nei pazienti con ipercolesterolemia familiare omozigote il dosaggio iniziale è il secondo, che può essere eventualmente modificato, aumentando la frequenza della somministrazione a due settimane, qualora non vi fossero risultati rilevanti.

Nel caso probabile in cui il paziente omozigote sia in trattamento con l'afesi lipoproteica, la posologia raccomandata di evolocumab è direttamente di 420 mg ogni due settimane, da somministrare in modo tale che corrisponda alla pianificazione dell'afesi.

L'emivita mediana di alirocumab è di 12 giorni, mentre l'emivita di evolocumab si attesta tra gli 11 e i 17 giorni.

I farmaci raggiungono le rispettive concentrazioni sieriche massime nel giro di 3-7 giorni. [36], [37]

4.1.2.2. Effetti avversi

Gli effetti collaterali riscontrati riguardano principalmente reazioni al sito di iniezione, come emorragie, lividi o eritemi.

Gli unici dubbi rimasti sulla sicurezza di questi mAb riguardano la loro immunogenicità, con reazioni comuni ($\geq 1/100$, $<1/10$) di ipersensibilità o di influenza e nasofaringite.[36], [37]

Inoltre, la presenza di PCSK9 a livello di vari tessuti, ha messo in allerta i ricercatori sui possibili effetti di questi farmaci su altri processi tissutali.

Per esempio, a livello pancreatico il colesterolo è di fondamentale importanza nel metabolismo delle cellule β e nella formazione delle vescicole attraverso le quali viene secreta l'insulina. È stato dimostrato come, in pazienti con mutazione genetica LOF (loss of function) per PCSK9, che è stata dimostrata essere una mutazione cardioprotettiva, si ha un rischio aumentato di incidenza di diabete di tipo 2, per accumulo di colesterolo a livello pancreatico e blocco del rilascio di insulina. Quindi l'insulina viene comunque prodotta, ma non viene rilasciata in circolo.[35]

L'utilizzo degli inibitori di PCSK9 però non ha portato all'aumento di questo rischio, evidenziando come l'insorgenza di diabete di tipo 2 è da correlare ai livelli di PCSK9 prodotti localmente dalle cellule pancreatiche (e quindi alla presenza di una mutazione LOF) e non ai livelli di PCSK9 circolanti, su cui agiscono i mAb.

Anche a livello cardiaco la mancanza di PCSK9 porta a lipotossicità per accumulo di lipidi e alterazione del metabolismo energetico cellulare, ma nuovamente è un effetto legato alla sintesi locale cardiaca di PCSK9 e non all'inibizione dell'enzima circolante.[35]

Per quanto riguarda gli effetti degli inibitori di PCSK9 sul sistema nervoso sappiamo che l'eventuale inibizione di questo enzima in tale sito potrebbe promuovere l'insorgenza o la progressione dell'Alzheimer, data l'elevata importanza di PCSK9 e del colesterolo a livello nervoso. Sembra che la proproteina sia coinvolta nella clearance della β -amiloide, per effetto sulla proteina di membrana CD36. Ulteriori studi devono essere condotti sul ruolo di questo enzima in tale patologia: quanto è stato dimostrato fin ora è che l'utilizzo di questi farmaci non comporta effetti collaterali gravi sul SN.

Non sono state dimostrate differenze cognitive significative tra i pazienti trattati con i mAb e quelli del gruppo placebo. [38]

L'unico effetto collaterale comune riportato sull'RCP AIFA, riguardante il sistema nervoso, è la cefalea.[36], [37]

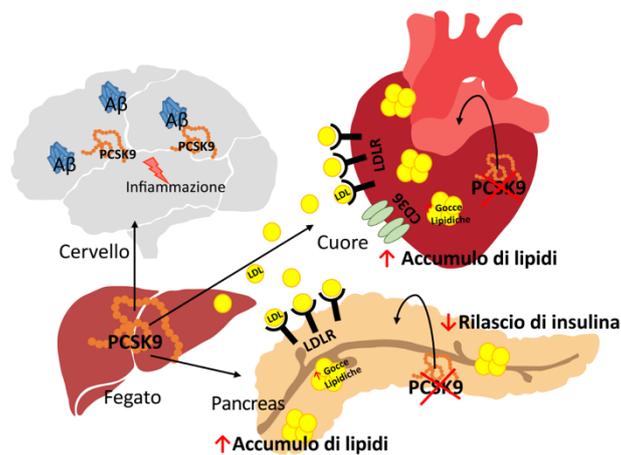


Figura 27. Siti di produzione di PCSK9. [35]

4.1.2.3. Terapia

In uno studio del 2018 è stata valutata la validità dell'associazione di statine ad alta intensità ed alirocumab in pazienti con una storia di sindrome coronarica acuta.

La coorte era costituita da pazienti affetti da sindrome coronarica acuta da 1 a 12 mesi prima dello studio e con valori plasmatici precisi: LDL-C di almeno 70 mg/dL, non-HDL-C di almeno 100 mg/dL oppure ApoB di almeno 80 mg/dL (valori misurati in seguito a un periodo in terapia con statine ad alta intensità alla massima dose tollerata, dunque non soddisfacenti).

Il primo risultato ottenuto dall'analisi dei dati ha consentito di stabilire che nei pazienti in trattamento con entrambi i medicinali si ha una riduzione statisticamente significativa del rischio di morte per malattia coronarica cardiaca, rischio di infarto cardiaco, ischemia o angina instabile rispetto ai pazienti in terapia con statina e placebo (9.5% vs 11.1% con Hazard Ratio = 0.85 $p < 0.001$).

Anche l'incidenza di qualsiasi tipo di evento cardiovascolare è stata significativamente ridotta (13.7% vs 15.6% con HR =0.87).

Un'informazione interessante riguarda l'individuazione della popolazione su cui alirocumab presenta la sua massima efficacia, ovvero i pazienti con valori di LDL-C uguali o superiori a 100 mg/dL.

Gli effetti collaterali registrati non hanno dimostrato differenze tra i due gruppi tranne le reazioni al sito di iniezione che sono state prevalenti nei pazienti trattati. [39]

Un articolo del 2022 ha valutato la riduzione dei livelli di ApoB da parte di alirocumab all'interno del programma ODISSEY e la correlazione esistente tra la riduzione di tali livelli e il rischio di eventi cardiovascolari avversi gravi.

Ricordiamo che l'apolipoproteina B è costituente fondamentale delle lipoproteine aterogeniche, come LDL e VLDL.

Gli autori hanno cercato di valutare se una variazione nella composizione strutturale delle lipoproteine pro-aterogeniche eventualmente indotta da alirocumab potesse fornire nuovi dati per la previsione del rischio di malattie cardiovascolari maggiori.

I risultati ottenuti hanno in primis confermato l'associazione statisticamente significativa tra valori elevati di ApoB e un rischio maggiore di eventi cardiovascolari avversi gravi. Infatti, nei pazienti in terapia con alirocumab, valori ridotti di ApoB dopo 4 mesi dall'inizio dell'assunzione hanno portato a una riduzione statisticamente significativa dell'incidenza di eventi cardiovascolari avversi gravi.

Dall'altro lato però, nel momento in cui i pazienti riuscivano a raggiungere i livelli di LDL-C o nonHDL-C indicati dalle linee guida europee come obiettivo terapeutico, non riuscivano ad ottenere contemporaneamente anche valori di ApoB al di sotto del limite prefissato ovvero 35 mg/dL.

Essendo ApoB un marker del rischio aterogenico, questo studio ci fa osservare il problema in modo diverso: anche nel momento in cui un medicinale, in questo caso alirocumab, consente il raggiungimento dei valori "ottimali" di LDL-C o nonHDL-C, non è detto che il rischio aterogenico sia totalmente assente. Bisogna tenere conto anche della concentrazione specifica dell'ApoB. [39]

Uno studio del 2022 ha valutato l'efficacia a lungo termine di evolocumab in pazienti con aterosclerosi.

Lo studio è stato diviso in due parti. Nella prima parte, "parent FOURIER", i pazienti sono stati randomizzati in due gruppi: uno ricevente evolocumab e l'altro il placebo. Nella seconda parte, "FOURIER-OLE", lo studio è stato trasformato in open label, trattando tutti i pazienti con evolocumab.

I livelli di LDL-C raggiunti dai due gruppi nello studio parent erano significativamente inferiori nel gruppo trattato, che ha raggiunto una mediana di 29 mg/dL (IQR: 18-47 mg/dL) rispetto al placebo con 89 mg/dL (IQR 74-111 mg/dL).

Dopo 12 settimane dall'inizio della parte di studio FOURIER-OLE i valori plasmatici di LDL-C ottenuti dai due gruppi diventati uno, entrambi trattati con evolocumab, avevano come mediana 30 mg/dL (IQR: 19-48 mg/dL), senza differenze importanti tra i due gruppi, come è possibile osservare dalla figura 28.

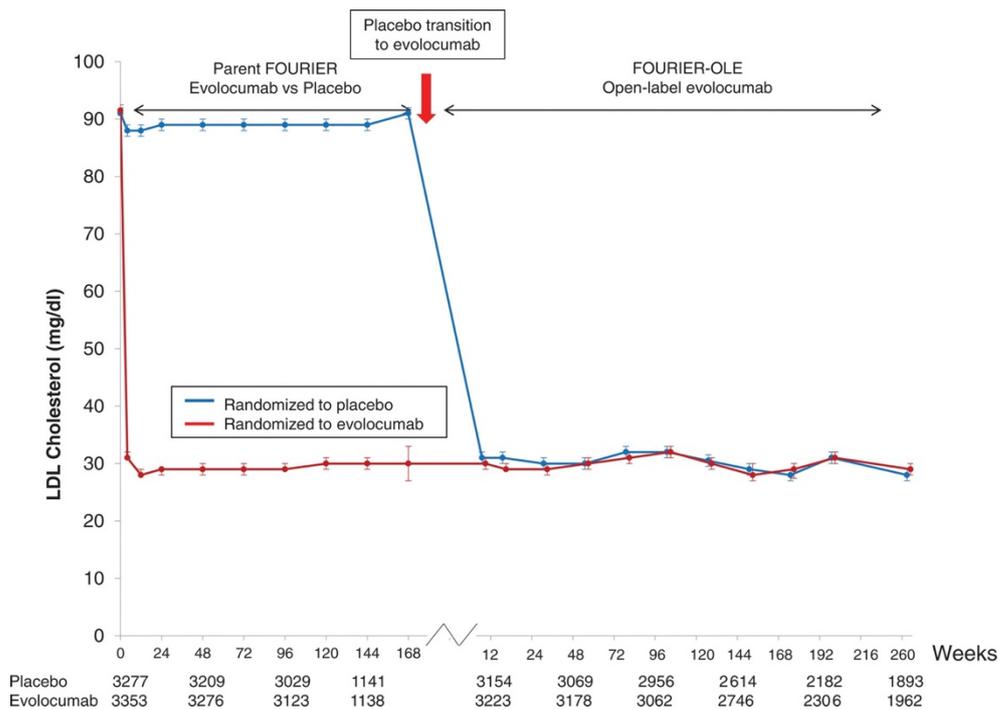


Figura 28. Concentrazioni mediane dei valori di LDL-C per tutta la durata dello studio parent e poi dell'open label FOURIER. [40]

Lo studio ha permesso di consolidare l'efficacia di evolocumab nel trattamento a lungo termine: considerando entrambe le fasi dello studio, la durata mediana di follow up è stata di 7.1 anni, con un follow up massimo di 7.8 anni.

Questo studio rappresenta il più lungo trial su un inibitore di PCSK9 eseguito fino ad oggi. Anche il profilo di sicurezza del farmaco è risultato adeguato, tenendo conto anche in questo caso della differenza tra trattati e placebo per quanto riguarda le reazioni nel sito di iniezione.

Rispetto ai pazienti che non hanno ricevuto evolocumab nella prima fase dello studio, i pazienti trattati con il mAb per tutta la durata di FOURIER hanno avuto un'incidenza inferiore di outcome primari quali morte cardiovascolare, infarto del miocardio o ischemia facendo intravedere un vantaggio clinico nel trattamento precoce con evolocumab.

Quindi, l'utilizzo di inibitori della PCSK9 a lungo termine è molto efficace (valori raggiunti di LDL-C < 40 mg/dL) e al tempo stesso sicuro e ben tollerato anche a lungo termine nei pazienti con malattia cardiovascolare aterosclerotica.[40]

In un altro studio del 2022 è stato valutato l'impatto della terapia con evolocumab sul fenotipo della placca ateromatosa nei pazienti in trattamento con statine ad alta o media intensità in seguito ad infarto.

I test eseguiti sono stati: angiografia coronarica, seguita da OCT (tomografia ottica computerizzata) ed ecografia intravascolare (IUVS). L'angiografia coronarica consente di valutare il flusso sanguigno nelle coronarie grazie ai raggi X e a un mezzo di contrasto.

Per quanto riguarda l'impatto di evolocumab sui livelli plasmatici lipidici, lo studio ha evidenziato differenze statisticamente significative tra i gruppi in terapia con l'associazione mAb e statine, rispetto al gruppo senza il mAb. Dopo 50 settimane l'LDL-C subiva una riduzione doppia con l'anticorpo (-114.2 +/- 41.7 mg/dL) rispetto alle sole statine (-55.3 +/- 47.1 mg/dL), con $p < 0.001$. Anche il valore di nHDL-C subiva una riduzione di 3 volte superiore nel gruppo con mAb rispetto a quello senza.

In questo studio è stata valutata anche la concentrazione di ApoB e del suo rapporto con l'ApoA-I: entrambi i valori hanno subito una riduzione statisticamente significativa nei pazienti in terapia con evolocumab. [41]

I parametri indagati nel fenotipo della placca ateromatosa sono stati lo spessore minimo del cappuccio fibroso (FCT, *Fibrous Cap Thickness*), come indice della stabilità della placca, ed il volume dell'ateroma.

Nel primo caso, l'assunzione di evolocumab insieme alla statina portava ad un aumento maggiore dello spessore del cappuccio fibroso rispetto alla monoterapia con statina. In particolare, un aumento di 42.7 μm contro 21.5 μm con $p = 0.015$.

Anche il volume percentuale della placca diminuisce maggiormente con l'anticorpo monoclonale rispetto alla sola statina con una riduzione di -2.29% (-19.0 mm^3) contro -0.61% (-8.9 mm^3) con $p = 0.009$.

Con questo studio è possibile considerare evolocumab come un farmaco efficace nel miglioramento del fenotipo della placca ateromatosa in pazienti con storia di sindrome coronarica acuta.[41]

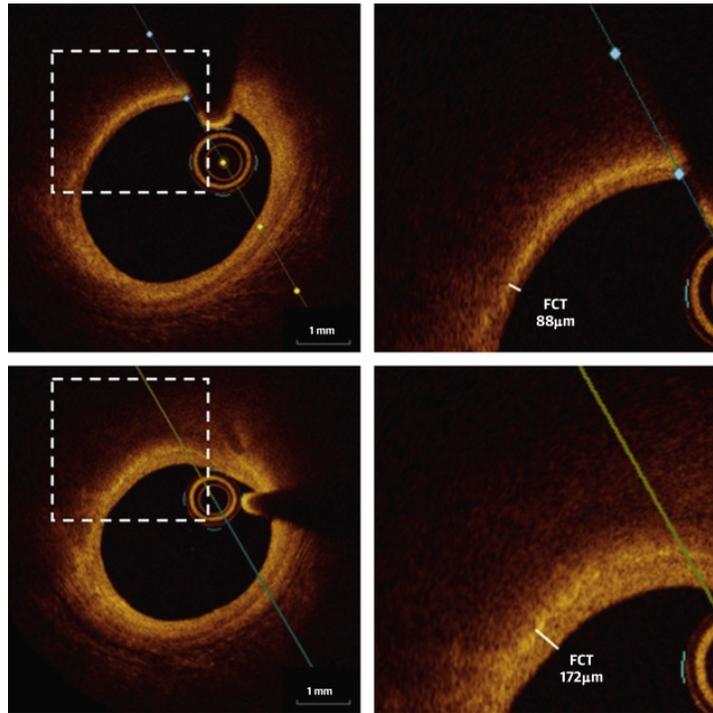


Figura 29. Evoluzione dell’FCT della placca aterosclerotica prima e dopo 50 settimane di utilizzo di evolocumab. [41]

Dunque, l’utilizzo di anticorpi monoclonali diretti contro la PCSK9 è una strategia efficace nel trattamento dell’ipercolesterolemia e nel miglioramento del quadro clinico dell’aterosclerosi.

In associazione con le statine questi mAb consentono di raggiungere obiettivi terapeutici migliori rispetto alla monoterapia con le stesse.

La posologia è preferibile rispetto agli ipolipemizzanti visti finora, poiché vede la somministrazione del farmaco ogni 2 o 4 settimane, invece che ogni giorno.

L’aspetto negativo riguarda la via di somministrazione che deve essere sottocutanea, data l’impossibilità di assorbire il mAb da parte del tratto GI e insieme a questa anche la necessità di conservare il medicinale in frigorifero tra i 2 °C e gli 8 °C.

4.1.3. Small interfering RNA contro la traduzione dell’mRNA codificante per PCSK9

Un altro modo per inibire l’azione di PCSK9 è quello di agire sulla sua biosintesi, in particolare sulla traduzione del suo mRNA. Per fare questo si utilizzano delle molecole dette siRNA, ovvero *small interfering RNA*, che sono dei doppi filamenti di RNA (dsRNA) lunghi dai 21 ai 23 nucleotidi.

Il meccanismo d'azione di queste molecole si basa sull'appaiamento con l'mRNA codificante per una determinata proteina, e la sua conseguente degradazione, in modo tale da bloccarne la sintesi e quindi inibirla a monte. [42]

I siRNA sono in alcuni casi molecole endogene mentre in altri esogene (per esempio di natura virale) a doppio filamento, caratterizzate da una totale complementarietà e dunque assenza di regioni non appaiate.[43]

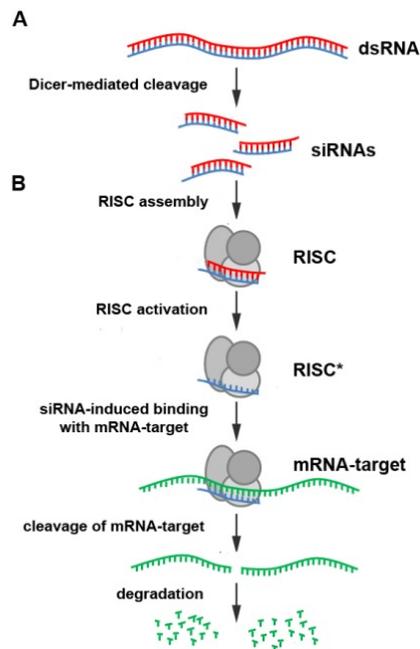


Figura 30. Meccanismo d'azione dei siRNA. [90]

Indipendentemente dalla loro origine, si ottengono a partire da un dsRNA (double stranded RNA), che viene processato sempre dall'enzima DICER dando origine alla molecola di siRNA, sempre a doppio filamento.

Il siRNA maturo lega altre proteine, tra cui Argonaute 2 (AGO2), dando vita al complesso siRISC (siRNA-induced silencing complex) e liberando il filamento senso. A questo punto il complesso siRISC contenente il filamento antisenso del siRNA può dirigersi verso la sequenza di mRNA complementare e degradarlo. [44]

I siRNA possono riconoscere solo una sequenza del tutto complementare alla propria, portandola alla degradazione.

Data la loro specificità in un rapporto 1 a 1, i siRNA vengono studiati per le loro applicazioni in ambito farmaceutico nei confronti di un gene specifico.

Purtroppo, le caratteristiche chimico-fisiche dei siRNA non sono prettamente favorevoli all'azione farmaceutica. Sono delle molecole di grandi dimensioni, cariche negativamente e per questo motivo la loro permeabilità di membrana non è assolutamente delle migliori: l'elevata densità di carica rappresenta un centro di idrofilia che impedisce al farmaco di legarsi alle proteine plasmatiche come l'albumina, favorendone l'eliminazione. [45]

Inoltre, sono target delle esonucleasi e delle endonucleasi (nello specifico delle RNAsi). Questi sono enzimi presenti naturalmente nelle nostre cellule, in grado di riconoscere e degradare filamenti di DNA o RNA grazie alla loro capacità di idrolizzare il legame fosfodiesterico. [44]

Tutte queste caratteristiche non solo ostacolano il farmaco nel raggiungimento del suo sito d'azione, ma ne riducono l'emivita e ne impediscono un'adeguata concentrazione nel sito stesso. L'emivita media di un siRNA immodificato va da qualche minuto all'ora, tempo non sufficiente per esercitare l'azione farmaceutica.[44]

È quindi necessario intervenire sulla struttura base del siRNA per ottenere un derivato più atto al suo ruolo terapeutico, conosciuto anche come siRNA *stealth* (invisibile).

La prima modifica strutturale che può essere effettuata riguarda la funzionalizzazione della porzione zuccherina del siRNA. È stato dimostrato che il 2'-OH non è necessario al corretto funzionamento del farmaco; dunque, è possibile intervenire in questi siti all'interno della molecola.

La funzionalizzazione più conosciuta è sicuramente la 2'-O-Me, che consiste nella metilazione del gruppo ossidrilico in 2'; questa modifica è estremamente versatile, anche se sembrerebbe portare ad una ridotta attività del farmaco. Infatti, si è giunti alla conclusione che funzionalizzazioni con gruppi ingombranti in questa posizione non sono auspicabili per una buona attività farmacologica.

L'aggiunta in 2' di un gruppo 2,4-dinitrofeniletere, ha portato a siRNA con vantaggi importanti, tra cui l'aumento dell'affinità per il target e l'aumento della resistenza nei confronti delle nucleasi. Sempre in 2' può essere aggiunto anche un atomo di fluoro al posto dell'ossidrilico, che porta ad una modifica funzionale estremamente vantaggiosa in quanto in grado di aumentare la stabilità in circolo e l'affinità di legame. [45]

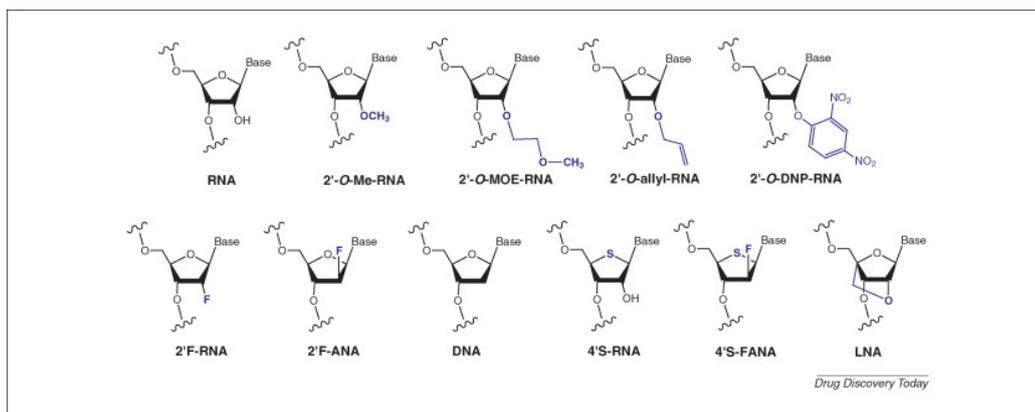


Figura 31. Possibili modifiche in posizione 2' dello zucchero del nucleotide. [45]

Anche il legame fosfodiesterico può essere modificato al fine di migliorare le performance del siRNA.

Si può sostituire con un legame fosforotioato, portando ad una potenza paragonabile o ridotta e in realtà causando anche possibile citotossicità se utilizzato più volte all'interno della molecola.

La principale alternativa è il legame boranofosfato che porta a vantaggi importanti quali aumento della potenza e della stabilità verso le nucleasi.

Altri legami sostitutivi sempre protettivi nei confronti delle nucleasi sono quello amidico oppure la sostituzione del legame fosfodiesterico 3'-5' con un legame fosfodiesterico 2'-5' anche se comporta una riduzione della potenza e può essere utilizzato solo nel filamento senso.[45]

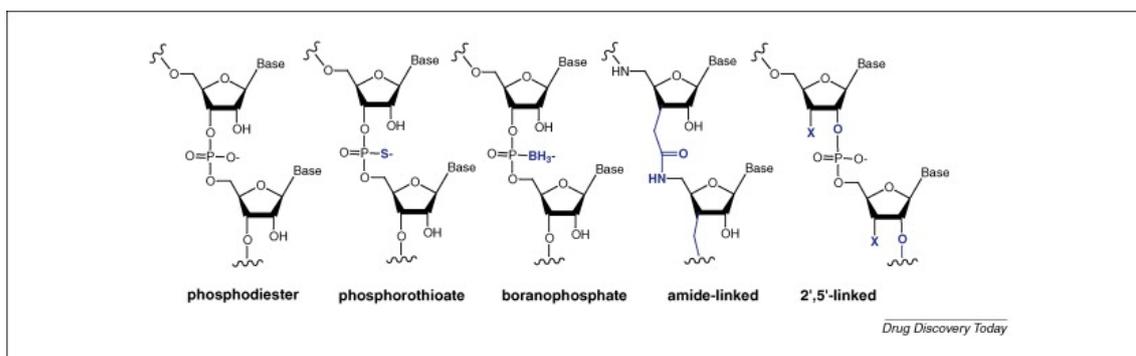


Figura 32. Possibili sostituzioni del legame fosfodiesterico. [45]

Anche la base dei nucleotidi può essere modificata, però è un intervento abbastanza raro. Un esempio vede l'utilizzo di 2-tiouracile o dello pseudouracile, che possono aumentare l'affinità di legame e la potenza. [45]

Per quanto riguarda l'aumento della stabilità della molecola in vivo e quindi della sua emivita, la struttura a doppio filamento è sicuramente utile ma non abbastanza per l'uso clinico.

Un primo metodo per proteggere il siRNA dalle nucleasi vede l'utilizzo di tante delle modifiche appena descritte, tutte insieme, causando una mimetizzazione estensiva della molecola, se non totale.

Un altro approccio è più conservativo e consiste nel proteggere le parti più vulnerabili della molecola modificando la posizione 2' del ribosio con atomi di fluoro o metilazioni (2'-F o 2'-O-Me) oppure l'estremità 3', soggetta all'azione delle esonucleasi. [45]

L'altro grande problema dei siRNA è la loro idrofilia e quindi la loro insufficiente capacità penetrare all'interno della cellula.

La possibilità di legare i siRNA a molecole idrofobiche, come steroidi o lipidi, è da tenere in considerazione per superare questo problema, oltre a permettere ai siRNA stessi di interagire con le proteine plasmatiche e le lipoproteine e quindi evitare la loro immediata eliminazione urinaria aumentandone così l'emivita.[45]

La specificità di tessuto è un altro aspetto importante per consentire al siRNA di raggiungere il suo target in concentrazioni adeguate e può essere ottenuta sempre attraverso la coniugazione del siRNA a molecole specifiche. Per esempio, la coniugazione dell'oligonucleotide al colesterolo ne consente il trasporto a livello epatico.

In alternativa sono stati studiati numerosi veicoli di trasporto, che sono delle macromolecole come il chitosano, le ciclodestrine o i dendrimeri di lisina che sono in grado di legarsi al siRNA sfruttando la sua carica negativa.

L'utilizzo dei liposomi resta comunque la strategia più performante nella veicolazione dei siRNA. I liposomi sono dei sistemi di drug-delivery costituiti da doppi strati fosfolipidici in grado di incapsulare la molecola di farmaco. Questi consentono di mantenere l'integrità della molecola e la sua natura chimico-fisica, pur proteggendola dalle nucleasi e permettendole di raggiungere l'interno della cellula.

Eventualmente i liposomi possono essere anche funzionalizzati da molecole di polietilenglicole, polimero idrofilo in grado di nascondere il liposoma e aumentarne quindi l'emivita plasmatica.[45]

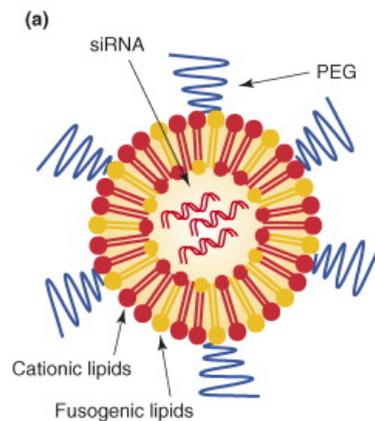


Figura 33. Rappresentazione grafica di un liposoma stealth PEG-ilato. [45]

Dunque, nonostante gli ostacoli in vivo, l'aspetto estremamente interessante di questi small interfering RNAs è che le loro applicazioni in campo farmacologico e quindi clinico sono notevoli, poiché aprono la possibilità di intervenire sul silenziamento di qualsiasi gene.

Le loro caratteristiche chimiche, per quanto ostacolanti, sono facilmente mascherabili dai nuovi sistemi di veicolazione o da modificazioni strutturali della molecola stessa, rendendoli degli ottimi candidati all'utilizzo in terapia.

4.1.3.1. Inclisiran

Come alirocumab ed evolocumab, anche inclisiran è un inibitore della proproteina della convertasi subtilisina/kexina di tipo 9, PCSK9, la cui funzione è già stata trattata all'inizio di questo capitolo.

Il suo meccanismo inibitorio, come del resto la natura del farmaco, è del tutto diverso rispetto a quello dei due anticorpi monoclonali.

Si tratta di un siRNA coniugato alla N-acetilgalattosamina triantennaria (GalNAc) con azione ipocolesterolemizzante.

Per quanto riguarda la sua struttura, la coniugazione con GalNAc costituisce una modifica essenziale al fine ultimo del medicinale: la sua presenza è necessaria per consentire al siRNA di entrare selettivamente nell'epatocita. La N-acetilgalattosamina triantennaria si lega ad ASGPR (*ASialoGlicoprotein Receptor*, una lectina epatica), consentendo l'uptake selettivo del siRNA.

In realtà, la sintesi di inclisiran non si limita alla coniugazione con GalNAc. Per stabilizzare il siRNA sono state aggiunte altre 4 modifiche, a partire da nucleotidi sostituiti con 2'-F, con 2'-O-Me, con la rimozione del gruppo OH in 2' e anche con la sostituzione del legame fosfodiesterico con il fosforotioato. [46]

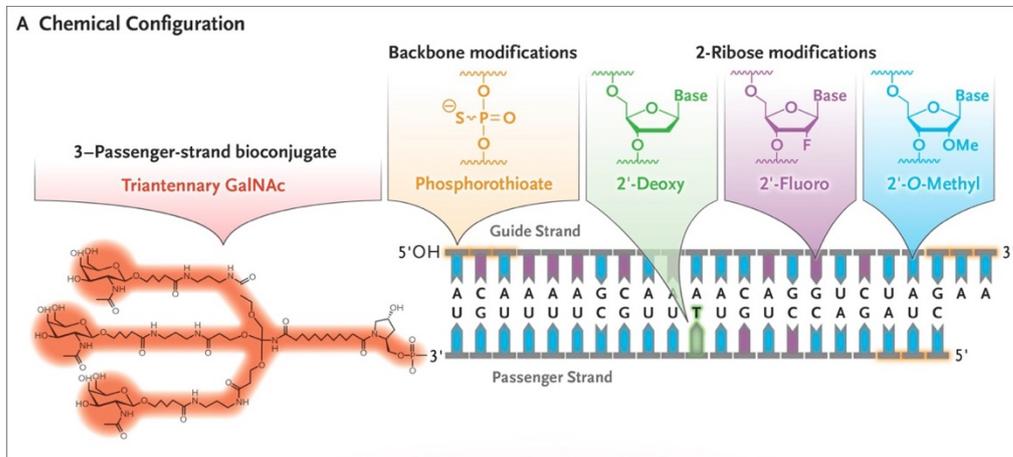


Figura 34. Struttura chimica di inclisiran. Il filamento senso è funzionalizzato con GalNAc triantennaria e con un nucleotide deossidato. In entrambi i filamenti, colorati in blu ci sono i nucleotidi funzionalizzati con il metile in 2', in viola con il fluoro in 2' mentre in arancione le sostituzioni del legame fosfodiesterico con un legame fosforotioato. [91]

Una volta entrato nell'epatocita grazie al riconoscimento tra GalNAc e ASGPR, il doppio filamento di siRNA si lega al complesso RISC (*RNA-induced silencing complex*) che rimuove il filamento senso del siRNA e promuove l'interazione del filamento antisenso con la sequenza di mRNA complementare, ovvero la sequenza di mRNA codificante per PCSK9. A quel punto la sequenza viene degradata e la proteina non viene più sintetizzata.

L'inibizione della sintesi di PCSK9 porta quindi ad un aumentato riciclo del recettore per le LDL, che aumenta l'uptake di LDL circolanti, riducendo la colesterolemia. [47]

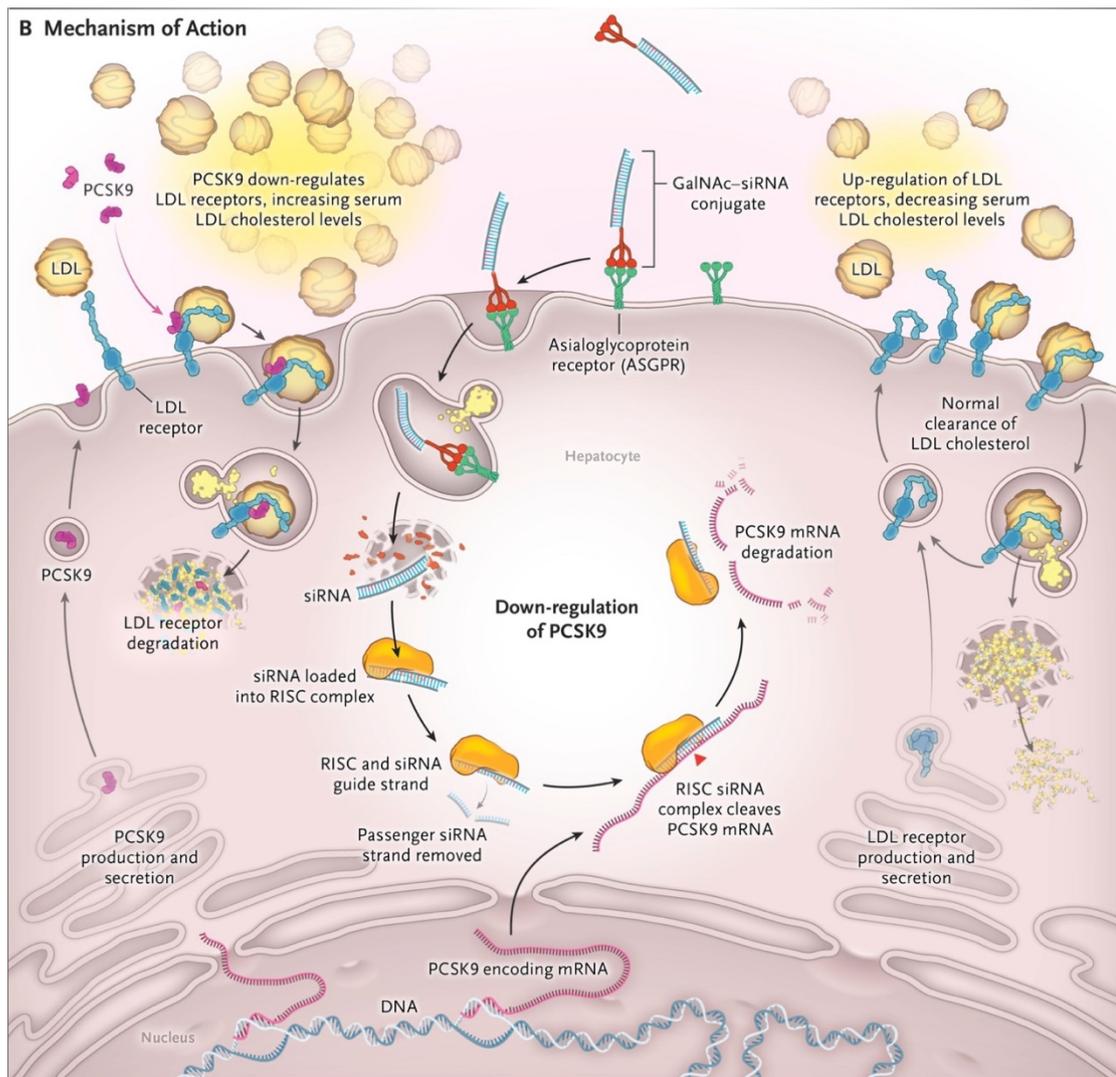


Figura 35. Al centro è raffigurato il meccanismo d'azione di inclisiran. Il primo step è di riconoscimento tra GalNAc e ASGPR con endocitosi del complesso. A quel punto il siRNA si stacca da GalNAc per essere rilasciato dall'endosoma nel citoplasma e legarsi al RISC. Il filamento senso del siRNA viene quindi rimosso mentre il filamento antisense con il RISC riconoscono la sequenza di mRNA codificante per PCSK9 e la degradano, impedendone la traduzione. A sinistra dell'immagine è stato rappresentato il normale funzionamento di PCSK9 che media la down-regulation di LDLR. A destra è raffigurato l'effetto dell'RNA interfering messo in atto da inclisiran, con l'up-regulation dei recettori per le LDL e conseguente aumento dell'uptake delle LDL dal circolo. [91]

Studi di farmacocinetica hanno attestato che la sua concentrazione plasmatica massima è raggiunta dopo 4 ore dalla somministrazione della dose prestabilita di 284 mg. Dopo 48 ore dalla somministrazione inclisiran non è più presente a livello plasmatico. La sua emivita è di circa 9 ore.

Il suo metabolismo è portato avanti dalle nucleasi che lo dividono nei suoi nucleotidi, mentre l'eliminazione segue al 16% la via renale. [47]

In generale, la terapia con siRNA prevede una somministrazione endovenosa, poiché sono molecole instabili, non assorbite a livello gastrointestinale e il cui assorbimento sottocutaneo è limitato dalla loro idrofilia. [42]

Nel caso di inclisiran si è riusciti a promuovere l'assorbimento sottocutaneo, consentendo l'utilizzo di tale via di somministrazione che rende molto più semplice il rapporto del paziente con la terapia e dunque la compliance.

Oltretutto, il paziente deve effettuare l'iniezione solo due volte l'anno, preconfezionate in siringhe preriempite contenenti 284 mg di siRNA ciascuna. La seconda iniezione è l'unica che va effettuata solo dopo 3 mesi dalla prima, mentre dalla seconda in poi la cadenza è semestrale. [47]

L'utilizzo in terapia di inclisiran è stato approvato in Europa dal dicembre del 2020 per il trattamento dell'ipercolesterolemia primaria e delle dislipidemie miste. È il primo siRNA ad essere approvato in questo campo. Nell'ambito dell'ipercolesterolemia primaria, può essere utilizzato anche per il trattamento dell'ipercolesterolemia familiare eterozigote.

L'assunzione di inclisiran è prevista in associazione con le statine per i pazienti in cui i tali farmaci non hanno permesso il raggiungimento degli obiettivi clinici.

Se il paziente è intollerante alle statine, inclisiran può essere assunto in monoterapia o in associazione ad altri farmaci ipocolesterolemizzanti. [47]

4.1.3.2. Effetti avversi

La somministrazione di inclisiran è stata considerata sicura sotto diversi punti di vista, anche se sono ancora in corso studi sulla sicurezza a lungo termine. Le principali reazioni avverse manifestatesi nei pazienti in trattamento con il siRNA sono state reazioni al sito di iniezione di natura lieve o moderata.

Trattando le caratteristiche degli anticorpi monoclonali inibitori di PCSK9, un dubbio importante riguardava il loro potenziale effetto su PCSK9 espressa in organi diversi dal fegato. Era stato studiato come l'eventuale inibizione di PCSK9 a livello cardiaco, pancreatico e cerebrale potesse portare a danni conseguenti al lipoaccumulo e quindi lipotossicità in tali organi, oltre che un aumentata incidenza di diabete di tipo 2 o effetti sullo stato cognitivo del paziente. È poi stato dimostrato come l'azione sulle PCSK9 plasmatiche di tali farmaci consenta di definire sicuro il loro utilizzo, che non inficia in alcun modo sulla sintesi e sul ruolo locale in ognuno di questi organi di tale proteina.

Nel caso del siRNA, questo è dotato di selettività d'azione nei confronti degli epatociti, conferitagli dalla coniugazione con GalNAc. Questa selettività consente di escludere a priori

eventuali effetti inibitori su PCSK9 espressa in altri tessuti, rappresentando quindi un aspetto favorevole per il profilo di sicurezza del farmaco stesso. [48]

4.1.3.3. Terapia

Gli studi clinici attualmente disponibili su inclisiran sono quelli appartenenti al programma VICTORION, che ne hanno consentito l'autorizzazione all'immissione in commercio.

Si tratta di studi che vanno dalla fase I alla fase III e che hanno valutato, come da prassi, la sicurezza del medicinale, la dose, il regime posologico appropriato e infine l'efficacia e la sicurezza del farmaco in terapia per l'essere umano.

Per gli effetti a lungo termine si stanno aspettando i risultati di altri trial clinici, ovviamente non ancora disponibili. [46]

Per quanto riguarda i trial di fase II, ORION-1,-2 e -3, questi hanno permesso di definire la dose e la posologia corretta di inclisiran nell'essere umano.

La dose approvata è stata attestata a 300 mg di inclisiran sale sodico (ovvero 284 mg di inclisiran non salificato), da assumere per la seconda volta dopo 90 giorni e dopodichè sempre ogni 180 giorni ovvero 6 mesi.[46]

I successivi trial di fase III, ORION-9,-10 e -11, hanno permesso di stabilire l'efficacia e la sicurezza clinica del regime posologico stabilito dai trial di fase II in diverse coorti di pazienti.[46]

ORION-9 è un trial clinico randomizzato a doppio cieco che ha visto la somministrazione di inclisiran in pazienti con ipercolesterolemia familiare eterozigote, la maggior parte dei quali in terapia con statine e più del 50% anche con ezetimibe. Nei pazienti in terapia con inclisiran è stata dimostrata una differenza statisticamente significativa nella riduzione dei valori plasmatici di LDL-C al giorno 510, sia nei confronti dei valori all'inizio dello studio (-39.7%) che nei confronti del gruppo placebo al giorno 510, nel quale i valori di LDL-C invece che diminuire sono aumentati (differenza delle variazioni di LDL-C tra i due gruppi di -47.9% con $p < 0.001$).

Essendo un trial clinico su pazienti con ipercolesterolemia familiare eterozigote è stato fatto un confronto anche sulla differenza nella riduzione dei livelli di LDL-C in base al genotipo della loro malattia. Il risultato interessante è che i valori di LDL-C raggiunti con l'utilizzo di inclisiran non sono stati significativamente diversi in base al genotipo, rendendo indifferente la causa genetica ai fini dell'efficacia del farmaco. [46]

In ORION-10 sono state fatte le stesse valutazioni con risultati analoghi in pazienti con ASCVD (Atherosclerotic Cardiovascular Disease). La differenza di variazione dei valori plasmatici di LDL-C al giorno 510 nel gruppo di trattati con inclisiran rispetto al placebo (con altri ipolipemizzanti) era del -52.3%. [46]

In ORION-11 è invece stata considerata una coorte di pazienti con ASCVD o pazienti con rischio cardiovascolare equivalente a quello dell'ASCVD, come diabete di tipo 2 o ipercolesterolemia familiare eterozigote. Anche in questi pazienti la differenza tra il gruppo trattato e il gruppo placebo nella riduzione dei livelli di LDL-C era statisticamente significativa con un valore percentuale di -49.9%. [46]

Per quanto riguarda gli effetti di inclisiran sulla Lp(a), altro fattore di rischio aterosclerotico, i suoi effetti sembrano essere paragonabili a quelli di alirocumab ed evolocumab, con una riduzione di Lp(a) del 26% rispetto al valore base, anche se devono essere condotti ulteriori studi.

Purtroppo, i dati clinici a nostra disposizione su inclisiran si fermano qui. Gli studi visti fin ora hanno consentito la commercializzazione del medicinale, data la sua efficacia nel ridurre i valori di LDL-C ed il suo profilo di sicurezza. È infatti nota, come per gli altri farmaci già visti, la relazione esistente tra la riduzione dei livelli plasmatici di LDL-C e la riduzione del rischio di eventi cardiovascolari.

Tuttavia, l'effetto diretto di inclisiran sugli outcome cardiovascolari non è ancora stato indagato. Tutti i farmaci trattati fin ora, inclusi i mAb inibitori di PCSK9, sono stati valutati sulla loro efficacia nel ridurre la mortalità cardiovascolare e gli eventi ad essa associata, tra cui il loro effetto sul volume e la composizione delle placche aterosclerotiche.

Invece, con inclisiran, ci si trova di fronte ad un farmaco non così poco studiato da essere ancora in trial clinico in attesa di AIC (Autorizzazione all'Immissione in Commercio), ma nemmeno abbastanza studiato da conoscere tutti gli effetti del suo utilizzo nel mondo reale e quindi il suo reale impatto sulla vita del paziente.

Ciò che è noto in questo momento è che inclisiran è un medicinale sicuro e che il suo utilizzo consente una riduzione dei valori di LDL-C ottimale (superiore al 50%) in popolazioni target (HeFH, ASCVD, o a rischio cardiovascolare) e analogo a quello delle statine ad alta intensità, il gold-standard di riferimento. [49]

La ricerca però non si ferma qui: attualmente sono in corso due diversi studi a lungo termine, sempre parte del progetto VICTORION. Si tratta di ORION-4 e di ORION-8

ORION-4 è uno studio clinico randomizzato a doppio cieco condotto con l'obiettivo di valutare l'efficacia di inclisiran nella riduzione di eventi cardiovascolari quali infarti o ictus. La coorte è costituita da pazienti che hanno già avuto manifestazioni di questo tipo oppure che si sono sottoposti ad un intervento di angioplastica o ad una procedura per sbloccare arterie ostruite.[50] I soggetti arruolati sono circa 15000 con malattia cardiovascolare aterosclerotica (ASCVD) e livelli di colesterolo totale superiori a 155 mg/dL. [49]

La durata dello studio è programmata a 5 anni e la randomizzazione è stata effettuata il 7 marzo 2019.

ORION-8 è invece uno studio open label a lungo termine sui pazienti di ORION-5,-9,-10 e -11 che ha come endpoint primario la valutazione di quanti pazienti con ASCVD riescono ad ottenere con inclisiran valori di LDL-C inferiori a 70 mg/dL. Mentre nei pazienti con malattie a rischio cardiovascolare equivalente a quello con ASCVD l'obiettivo dello studio è di raggiungere un livello di LDL-C inferiore ai 100 mg/dL.[49]

La durata stabilita di ORION-8 è di 4 anni: è iniziato il 16 aprile 2019 e finito il 13 febbraio 2023. Attualmente nessun risultato è ancora stato pubblicato. [51]

L'importanza di questi studi a lungo termine risiede, oltre che nel loro endpoint primario, nella valutazione degli effetti a lungo termine di una terapia cronica con inibitori di PCSK9 che portano ad una riduzione importante dei livelli plasmatici di LDL-C.

I pazienti che beneficeranno da questo tipo di medicinali sono malati gravi ad alto rischio cardiovascolare, che dovranno tenere sotto controllo con queste terapie i marker da rischio cardiovascolare per il resto della loro vita, nell'ottica di una terapia utile al suo scopo.

Fondamentale è dunque investigare, oltre agli effetti collaterali iniziali del farmaco, quali possono essere le ripercussioni a lungo termine di una terapia ipolipemizzante di questa portata, grazie alla quale i livelli di LDL-C possono arrivare addirittura al di sotto dei 30 mg/dL.

È esclusivamente un effetto protettivo oppure può causare dei problemi a lungo andare? Tenendo conto che i valori desiderabili di LDL-C in un individuo sano non a rischio sono al massimo di 100 mg/dL per l'Istituto Superiore di Sanità.[52]

La terapia con inclisiran sembra essere promettente, se non preferibile, rispetto a quella con gli anticorpi monoclonali contro PCSK9. Infatti, per quanto entrambe le tipologie di farmaci consentano il raggiungimento di valori di LDL-C ottimali, il siRNA consentirebbe una compliance maggiore da parte del paziente grazie alla somministrazione semestrale.

In generale, la strategia di inibizione della proproteina della convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 si è dimostrata efficace e sicura. Inoltre, ha consentito di aprire nuovi capitoli nella ricerca e

nella storia della farmacologia, con l'applicazione di tecnologie altamente selettive nei confronti del target desiderato e l'approvazione del primo siRNA per il trattamento dell'ipercolesterolemia. Questi farmaci rappresentano il futuro delle terapie croniche ed è importante, nel loro studio, confrontarsi con gli aspetti del mondo reale nel quale dovranno poi effettivamente essere utilizzati. Dunque, non resta altro che aspettare i dati sull'utilizzo a lungo termine del siRNA che per i mAb erano già stati analizzati.

4.2. Acido Bempedoico

Gli inibitori di PCSK9 hanno dimostrato un'efficacia terapeutica paragonabile a quella delle statine con minimi effetti collaterali.

Nonostante ciò, il fatto di doversi iniettare un medicinale piuttosto che assumerlo oralmente è scoraggiante per il paziente cronico.

L'approvazione dell'acido bempedoico ha rappresentato un'alternativa efficace per i medici, autorizzandoli alla prescrizione di un nuovo ipocolesterolemizzante efficace per via orale.

L'acido bempedoico è una molecola organica lineare molto semplice, con formula bruta $C_{19}H_{36}O_5$. La sua struttura è caratterizzata da una lunga catena di 15 atomi di carbonio simmetrica, funzionalizzata ad entrambe le estremità da un gruppo carbossilico (due in totale) e da due gruppi metilici (quattro in totale): è un chetodiacido tetrametil-sostituito. [53]

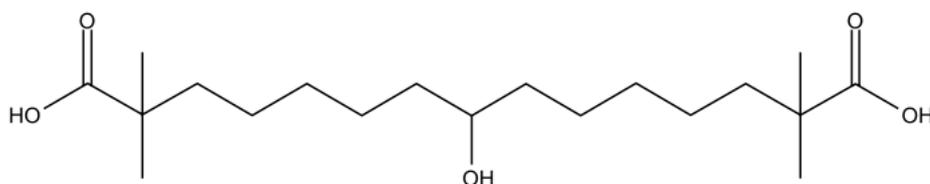


Figura 36. Struttura chimica dell'acido bempedoico [57]

Il suo sviluppo in ambito farmaceutico è iniziato nel 2003 come componente della famiglia degli "acidi grassi fraudolenti", detti anche anormali, di cui fanno parte i fibrati, gli acidi grassi omega-3 ed il gemcabene, un farmaco orfano per il trattamento dell'ipercolesterolemia familiare. Il loro nome deriva da quello dei nucleosidi fraudolenti, ovvero nucleotidi artificiali contenenti basi artificiali analoghe a purina o pirimidina, utilizzati nella terapia antitumorale.[54]

Gli acidi grassi fraudolenti sono strutturalmente analoghi agli acidi oleico o linoleico e sono in grado di promuovere il catabolismo degli acidi grassi per azione nel fegato. I loro target sono diversi e includono diversi enzimi o addirittura geni coinvolti nel metabolismo epatico.

Sono molecole altamente lipofile e caratterizzate dalla presenza di gruppi carbossilici. [54]

Lo sviluppo dell'acido bempedoico è iniziato quindi nel 2003 quando ancora veniva chiamato ETC1002. Questo farmaco venne scelto come *Lead Compound* tra una serie di acidi grassi fraudolenti sviluppati dall'azienda Esperion, che venne però acquisita successivamente da Pfizer con la conseguente interruzione del progetto.

La molecola venne ripresa in considerazione circa dieci anni dopo da Pfizer portando allo sviluppo di un nuovo farmaco che venne poi approvato in terapia da FDA e da EMA nel 2020. [54]

4.2.1. Meccanismo d'azione

L'acido bempedoico è il primo inibitore competitivo dell'ATP-citrato liasi (ACLY) ad essere stato approvato in terapia ed è un profarmaco. La sua azione è legata ad una precedente attivazione da parte della *very long-chain acyl-CoA synthetase-1* (ACSVL1), un enzima in grado di convertire l'acido bempedoico in bempedoil-coenzima A.[53]

L'ATP-citrato liasi è un enzima appartenente alla famiglia delle acil-CoA sintetasi. La sua struttura è omotetramerica ovvero costituita da quattro subunità identiche, ciascuna del peso di 120 kDa e composta da 1101 amminoacidi. Si trova prevalentemente a livello citoplasmatico, dove è ancorata al reticolo endoplasmatico, ma anche a livello nucleare.[55]

Nella sua struttura sono stati identificati 5 domini funzionali. Il dominio 1 è responsabile del legame con il coenzima-A mentre il dominio 2 contiene un residuo di istidina fosforilata: insieme

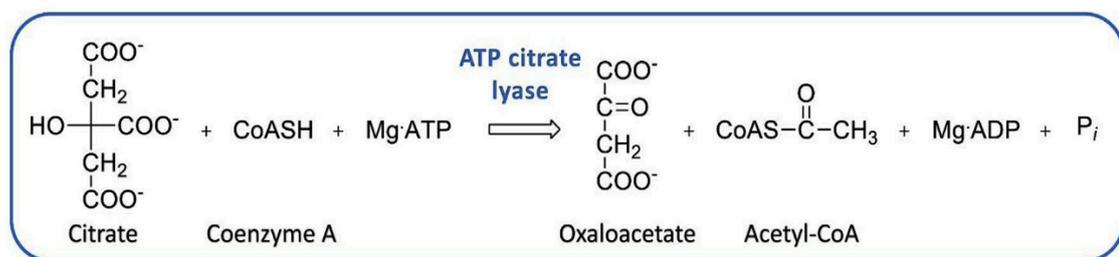


Figura 37. Reazione di conversione del citrato e del coenzima-A in ossalacetato e acetil-CoA, mediata dall'ATP-citrato liasi. [55]

costituiscono la subunità- α . I domini 3 e 4 legano l'ATP mentre il dominio 5 interagisce con il 2 a formare un'elica, sito del legame con il citrato. [55]

L'ACLY è coinvolto sia nel metabolismo dei lipidi che in quello del glucosio.

Partendo dal glucosio, quando la concentrazione di quest'ultimo aumenta in circolo viene captato dall'epatocita e trasformato in piruvato con la glicolisi. Il piruvato viene trasformato ad acetyl-CoA nei mitocondri, che è indispensabile insieme all'ossalacetato per la sintesi mitocondriale del citrato ovvero per il ciclo di Krebs. Una volta sintetizzato il citrato raggiunge il citoplasma dove l'ATP-citrato liasi lo scinde in acetyl-CoA e ossalacetato.

L'acetyl-CoA è un precursore per la sintesi degli acidi grassi oppure del colesterolo, rispettivamente quando viene convertito a malonyl-CoA oppure ad acetoacetyl-CoA. L'acetyl-CoA ha un ruolo importante anche a livello nucleare nell'acetilazione degli istoni.

Invece, l'ossalacetato viene subito convertito a malato e poi nuovamente ad ossalacetato nei mitocondri nel ciclo di Krebs. L'altra via dell'ossalacetato è la gluconeogenesi, mediante la quale si ha la sintesi di glucosio a partire dal fosfoenolpiruvato. [55]

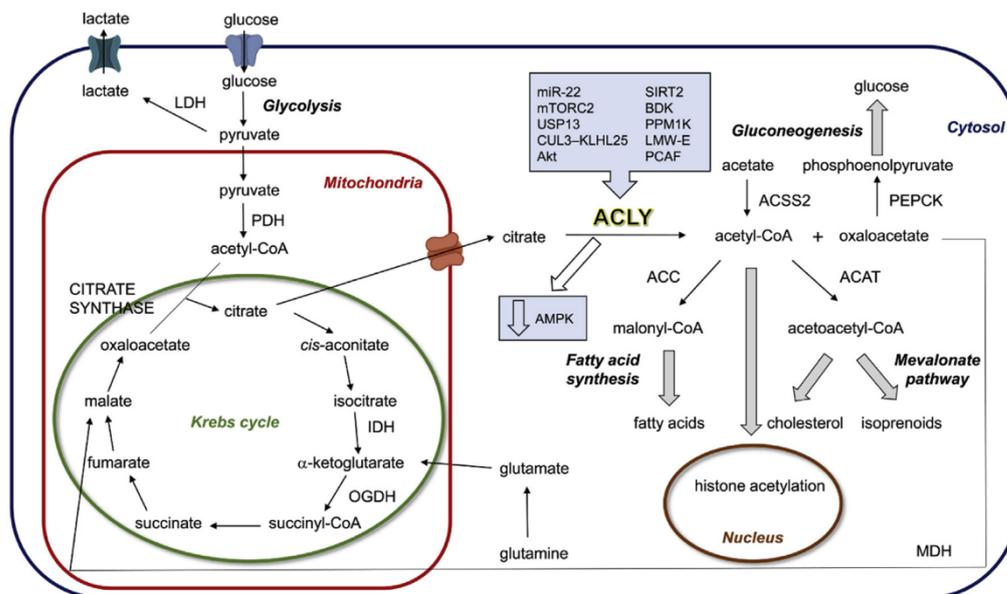


Figura 38. Ruolo dell'ATP-citrato liasi (ACLY) nel metabolismo del glucosio e dei lipidi. Sulla sinistra, all'interno dei mitocondri, è stato descritto il ciclo di Krebs che porta alla sintesi del citrato, substrato poi dell'ACLY. Sulla destra, nel citoplasma sono stati riportati gli step di riconversione del citrato in acetyl-CoA e ossalacetato, e i loro successivi ruoli nella gluconeogenesi e nel metabolismo lipidico. [55]

Dunque, l'inibizione della ATP-citrato liasi non porta solo alla riduzione della sintesi di colesterolo e alla conseguente sovra espressione dei recettori per le LDL. L'effetto dell'inibizione dell'enzima si manifesta anche sul metabolismo del glucosio che viene interrotto con blocco della gluconeogenesi.

In entrambi i casi i due metabolismi vengono interrotti per mancanza di substrati e con conseguente riduzione dei livelli plasmatici sia di LDL che di glucosio.

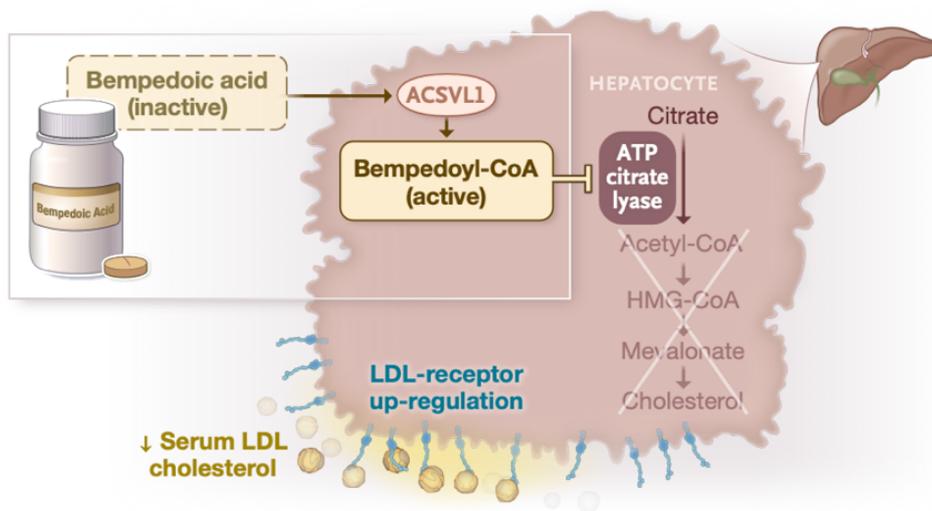


Figura 39. Selettività d'azione dell'acido bempedoico. In questa immagine è possibile comprendere la differenza negli effetti collaterali tra statine e acido bempedoico, nonostante l'azione sullo stesso pathway biosintetico. Le statine sono in grado di inibire la sintesi del colesterolo sia a livello epatico che a livello muscolare, poiché non necessitano di attivazione e dunque agiscono come tali, senza selettività. Nemmeno l'acido bempedoico sarebbe selettivo nei confronti dell'epatocita, ma come tale non è nemmeno attivo a livello epatico: essendo un profarmaco deve essere attivato e la sua attivazione avviene solo in presenza dell'ACSVL1 che si trova solo a livello epatico. Ecco spiegato perché l'utilizzo delle statine porta ad effetti avversi muscolari, al contrario dell'acido bempedoico che non viene attivato a livello muscolare. [56]

La conversione dell'acido bempedoico a bempedoil-CoA avviene a livello epatico, rendendo la molecola estremamente selettiva nei confronti dell'epatocita.

Poiché questo farmaco agisce sullo stesso pathway delle statine, era stato ipotizzato che, tra gli effetti collaterali, si potessero manifestare dolori muscolari. Tuttavia, tali effetti collaterali non si sono presentati in modo significativo con l'acido bempedoico: questo aspetto positivo è da attribuire all'assenza di ACSVL1 a livello muscolare.[56]

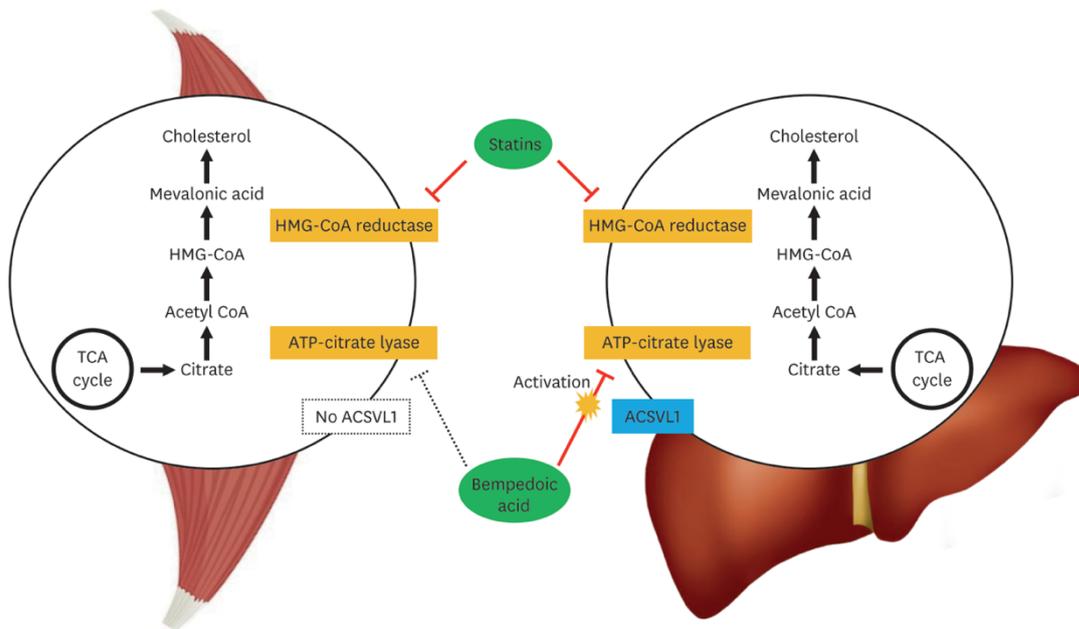


Figura 40. Meccanismo d'azione dell'acido bempedoico. La molecola viene assunta come profarmaco e la sua azione si verifica selettivamente a livello epatico, dove si trova l'enzima ACSVL1 in grado di attivarla a bempedoil-CoA. L'effetto inibitorio della sua forma attiva sulla via biosintetica del colesterolo comporta un'aumento dell'espressione dei recettori per le LDL con conseguente aumento dell'uptake di LDL-C plasmatiche e la riduzione della loro concentrazione plasmatica. [60]

4.2.2. Farmacocinetica

L'acido bempedoico è stato approvato per l'utilizzo in terapia alla dose di 180 mg/die per via orale. La molecola raggiunge la sua C_{max} dopo 3.5 ore dalla somministrazione, mentre lo *steady state* è raggiunto dopo 7 giorni di terapia. La sua emivita plasmatica è all'incirca di 21 ore (15-24 ore) con una percentuale superiore al 99% di legame alle proteine plasmatiche. [53]

Il suo metabolismo avviene principalmente attraverso glucuronidazione con la formazione del derivato acil-glucuronide inattivo; può essere anche convertito reversibilmente nel suo metabolita attivo ESP15228 per opera dell'aldo-cheto reductasi e anche ESP15228 può essere glucuronidato oppure riconvertito ad acido bempedoico.

Per quanto riguarda l'escrezione, dopo la somministrazione di 240 mg di principio attivo il 62.1% della dose (metaboliti inclusi) viene eliminata per via renale mentre il 25.4% con le feci.

La quota di farmaco eliminata imm modificata in ambo le vie è inferiore al 5%. [57]

Attualmente l'acido bempedoico ha ricevuto l'AIC sia per l'utilizzo in monoterapia ma anche come associazione preformata con ezetimibe.

Non è stata dimostrata alcuna interazione farmacocinetica clinicamente significativa nella somministrazione dei due farmaci insieme.

L'unico effetto degno di nota, è la riduzione dei valori di C_{max} di ezetimibe e del suo derivato glucuronide nell'associazione preformata rispetto alla somministrazione di due compresse distinte in concomitanza. Al contrario però, l'AUC delle due molecole in preassociazione è aumentata di 1.6 e 1.8 volte rispettivamente, dimostrando una buona esposizione al farmaco anche con l'associazione preformata, preferibile per la compliance e per i costi.

A cos'è dovuto l'aumento dell'AUC? L'acido bempedoico è in grado di inibire un trasportatore polipeptidico per anioni organici renale (OATP1B1) portando a diversi effetti, tra cui una diminuzione dell'eliminazione renale di ezetimibe-glucuronide che resta in circolo più a lungo. [58]

Per quanto riguarda l'associazione dell'acido bempedoico con le statine, non è presente una forma farmaceutica preconstituita che contenga entrambi i farmaci.

Nonostante ciò, nella maggior parte dei trial clinici i pazienti della coorte erano in terapia con statine e questo ha permesso di valutare eventuali interazioni farmacologiche.

Quando l'acido bempedoico è somministrato in una dose da 240 mg insieme a simvastatina 20 mg si ha un aumento dell'AUC della statina pari a 2 volte quello normale. Se l'associazione prevede una dose da 180 mg insieme a simvastatina 40 mg, l'aumento di AUC è invece di una volta e mezza. La motivazione è da ricercare sempre nell'inibizione da parte dell'acido del trasportatore OATP1B1.[53]

Quindi, l'utilizzo dei due farmaci in associazione aumenta l'esposizione totale del paziente alla statina (con conseguente aumento dei suoi effetti collaterali) senza consentire però un effetto additivo di riduzione delle LDL: i due farmaci agiscono sullo stesso pathway metabolico e se il paziente è già esposto alla massima dose tollerata di statina, è difficile che l'associazione con l'acido bempedoico porti a risultati maggiori o comunque significativi.

Una meta-analisi di studi di fase tre ha dimostrato come l'associazione con ezetimibe sia preferibile a quella con le statine sulla base della percentuale di riduzione dei livelli plasmatici di LDL-C.

La monoterapia con acido bempedoico (nei pazienti intolleranti alle statine) porta a una riduzione media del 24.5% delle LDL-C, mentre il suo utilizzo insieme alle statine le riduce in media del 17.8%.

La terapia in associazione preformata con ezetimibe porta invece a una riduzione media del 38% delle LDL-C, decretando un'efficacia superiore. [53]

4.2.3. Effetti avversi

La terapia con acido bempedoico è considerata sicura, ma non priva di effetti avversi. I principali eventi registrati e con incidenza statisticamente significativa rispetto a un gruppo placebo sono stati: spasmi muscolari, iperuricemia, infezioni alle vie aeree, anemia e valori elevati di enzimi epatici. [57]

Come già anticipato, il farmaco è in grado di inibire il trasportatore per anioni organici che si trova nei tubuli renali, causando anche un aumento dei livelli plasmatici di acido urico. Questo ha avuto le sue ripercussioni sulla salute dei pazienti per i quali è aumentata significativamente l'incidenza di gotta (1.4% nei pazienti trattati contro 0.4% nei pazienti del gruppo placebo).

In uno studio di fase 3 l'aumento medio dei livelli plasmatici di acido urico dopo 12 settimane di trattamento è stato di 0.82 mg/dL contro l'aumento nel gruppo placebo che è stato di 0.02 mg/dL. Data la sua natura l'effetto è fortunatamente reversibile con l'interruzione della terapia. [59]

Per quanto riguarda il suo effetto sulla glicemia o sul NOD (new-onset diabetes) l'acido bempedoico non ha causato problemi. Al contrario, è stata osservata una riduzione dei valori di emoglobina A1c nei pazienti con diabete o prediabete. È noto come l'emoglobina glicata (HbA1c) sia un marker molto importante per la malattia diabetica in quanto esprime il valore medio della glicemia nei tre mesi precedenti al prelievo. [59]

Inoltre, nonostante l'azione selettiva a livello epatico, è stato dimostrato un aumento significativo delle miopatie quando si utilizzano in associazione l'acido bempedoico e simvastatina o pravastatina (a media o alta intensità). Per questo motivo l'associazione di questi farmaci è sconsigliata, sulla base delle motivazioni già viste nel paragrafo 2.2. [59]

4.2.4. Terapia

L'utilizzo in terapia dell'acido bempedoico in monoterapia (180 mg/die) o in associazione prestabilita con ezetimibe (180 mg+10 mg /die) è stato autorizzato nel 2020 prima dall'FDA, poi dall'EMA.

Nell'Unione Europea il suo utilizzo è destinato al trattamento della dislipidemia mista e dell'ipercolesterolemia primaria, tra cui anche la familiare eterozigote.

I regimi terapeutici variano in base alla gravità della malattia e all'eventuale intolleranza ad altri farmaci ipocolesterolemizzanti.

Normalmente viene utilizzato in associazione ad una statina nei pazienti che non hanno ancora raggiunto gli obiettivi terapeutici di LDL-C. Se i pazienti sono intolleranti alle statine allora può essere utilizzato in monoterapia oppure in associazione con ezetimibe. [58]

Gli studi clinici di fase tre condotti sull'acido bempedoico sono 4 in totale (progetto CLEAR: *Cholesterol Lowering via BEmpedoic Acid, an ACL-inhibiting Regimen*) e si differenziano tra quelli che hanno preso in considerazione pazienti in terapia concomitante con statine oppure pazienti intolleranti alle statine.

I trial clinici HARMONY e WISDOM hanno considerato l'efficacia e la sicurezza clinica dell'acido bempedoico in pazienti in terapia con statine e afflitti da malattia cardiovascolare aterosclerotica (ASCVD) e/o ipercolesterolemia familiare eterozigote.

In entrambi gli studi sono stati raggiunti l'endpoint primario di sicurezza e l'endpoint secondario di riduzione percentuale statisticamente significativa dei livelli plasmatici di LDL-C. In particolare, nel primo studio la riduzione è stata del 18.1% rispetto al placebo, mentre nel secondo studio del 15.1% contro il gruppo placebo.

Anche l'ApoB è stata ridotta del 11.9% e del 9.3% rispetto al gruppo placebo.

La proteina C reattiva ha subito una riduzione del 21.5% e del 18.7% rispetto al placebo.[59]

Un altro trial ha valutato l'efficacia della terapia predosata 180 mg/10 mg di acido bempedoico con ezetimibe. L'associazione ha dimostrato una riduzione dei valori di LDL-C del 36.2%, statisticamente significativa nei confronti delle riduzioni ottenute con il solo acido (17.2%), con il solo ezetimibe (23.2%) o con il placebo.[59]

Nei trial di fase tre SERENITY e TRANQUILITY è stata valutata la riduzione di LDL-C con l'acido bempedoico nei pazienti intolleranti alle statine, per i quali l'efficacia di questo farmaco ha un'importanza molto elevata. Con SERENITY è stata dimostrata una differenza statisticamente significativa nella riduzione delle LDL-C da parte del farmaco rispetto al placebo, pari al 26%.

Inoltre, un aspetto molto importante emerso da questi trial è che l'incidenza di mialgie è stata superiore nel gruppo placebo rispetto al gruppo trattato con acido bempedoico, dimostrando la selettività del farmaco e giustificando l'aumento dell'incidenza di mialgie quando somministrato in associazione con le statine. [59]

Tutti questi studi di fase tre hanno contribuito all'approvazione del medicinale come ipocolesterolemizzante, data la sua efficacia nel ridurre i valori plasmatici di LDL-C.

L'approvazione è stata fatta nel 2020 e per questo c'è stato il tempo di portare a termine un ulteriore studio clinico sugli outcome cardiovascolari, che ha permesso di valutarne il peso a lungo termine sullo stato di salute del paziente.

Lo studio in considerazione è il *CLEAR Outcomes*, iniziato il 22 dicembre 2016 e concluso il 7 novembre 2022, per un totale di quasi sei anni di studio.

La randomizzazione ha coinvolto 13970 pazienti dai 18 agli 85 anni d'età, intolleranti alle dosi delle linee guida di statine e ad alto rischio cardiovascolare. Dunque, nella popolazione in studio i pazienti avevano espresso il fatto di non poter assumere le statine o di non volerle assumere a causa dei loro effetti collaterali, pur conoscendo i loro benefici.

Durante lo studio i pazienti potevano assumere altre terapie come ezetimibe, sequestranti biliari, inibitori di PCSK9 ed eventualmente anche statine se a dosi giornaliere insignificanti.

La terapia con acido bempedoico somministrata al gruppo trattato consisteva in una compressa giornaliera da 180 mg di principio attivo.

L'endpoint primario composito è costituito dai quattro principali eventi cardiovascolari gravi: morte per cause cardiovascolari; infarto del miocardio non fatale; ischemia non fatale; rivascolarizzazione coronarica.

L'endpoint secondario composito prende in considerazione i primi tre eventi cardiovascolari appena descritti oltre che l'avvento di infarto del miocardio fatale o non, la rivascolarizzazione coronarica, l'ischemia fatale o non, la morte per cause cardiovascolari o la morte per qualsiasi causa durante lo studio.[60]

Dopo sei mesi dalla randomizzazione sono stati ottenuti i seguenti risultati.

Per quanto riguarda l'endpoint primario, l'assunzione di acido bempedoico ha ridotto l'incidenza dei quattro eventi cardiovascolari gravi, con un HR tra i due gruppi pari a 0.87 ($p = 0.004$).

Nell'endpoint secondario è stata ridotta l'incidenza dell'endpoint composito a tre eventi cardiovascolari gravi (HR = 0.85 $p = 0.006$), dell'infarto del miocardio fatale o non fatale (HR = 0.77 $p = 0.002$) e della rivascolarizzazione coronarica (HR = 0.81 $p = 0.001$). L'incidenza degli altri eventi (ischemia fatale o non fatale, morte per cause cardiovascolari oppure morte per qualunque causa) non ha subito una riduzione statisticamente significativa. [60]

Anche se non rappresenta l'obiettivo dello studio la riduzione dei valori di colesterolo LDL-C è stata significativamente superiore nel gruppo trattato con una percentuale del -21.1% rispetto al -0.8% nel gruppo placebo.

Il livello medio di LDL-C raggiunto nel gruppo trattato era di 107.0 mg/dL al contrario del placebo con 136 mg/dL. Il motivo per cui i valori di LDL-C sono ancora così elevati dopo sei mesi,

nonostante l'efficacia già dimostrata dell'acido bempedoico, è legato a uno dei bias di questo studio, ovvero che tutti i pazienti in studio erano intolleranti alle statine e questo ha portato ad avere un valore medio baseline di LDL-C più elevato rispetto agli altri studi. [60]

Questi dati sono di fondamentale importanza per valutare l'efficacia e la sicurezza dell'utilizzo di questo farmaco in terapia a lungo termine, tenendo conto che la durata media al follow-up è stata di 40.2 settimane. Ovviamente dovranno essere effettuate ulteriori analisi sul trial, ma già da questo primo articolo è stato possibile considerare l'acido bempedoico non più solo per i suoi effetti sui livelli plasmatici di LDL-C, ma anche per i suoi benefici statisticamente provati sulla riduzione degli eventi cardiovascolari. [60]

Un altro aspetto molto interessante riguarda la quota delle partecipanti di sesso femminile, che è del 48% sul totale, molto alta rispetto alla norma dei trial clinici. È stato quindi possibile valutare la differenza tra gli hazard ratio degli outcome primario e secondario tra uomini e donne, che non è stata significativa. [60]

Il vantaggio principale che è stato sottolineato da questo trial riguarda l'efficacia dell'acido bempedoico nel ridurre la proteina C reattiva, anche se il meccanismo attraverso cui è in grado di farlo non è ancora noto.

C'è stata una differenza statisticamente significativa nella variazione mediana di CRP tra il gruppo trattato e il placebo di 21.6 punti percentuali.

Altri medicinali ipocolesterolemizzanti e utili nel ridurre gli outcome cardiovascolari, come ezetimibe o gli inibitori della PCSK9, non hanno dimostrato questa proprietà e non si sono rivelati efficaci nel ridurre la concentrazione di marker associati a stati infiammatori. [60]

Rispetto alle statine è importante sottolineare nuovamente come l'acido bempedoico non abbia dimostrato aumenti nella concentrazione plasmatica di emoglobina glicata o di incidenza di NOD (*new-onset diabetes*).[60]

Quello che si può quindi evincere dai risultati degli studi disponibili è che l'acido bempedoico è una molecola semplice da sintetizzare, dal basso costo e di buona efficacia ipocolesterolemizzante oltre che sulla riduzione degli eventi cardiovascolari.

Come tale è in grado di agire anche sugli stati infiammatori tipici delle malattie cardiovascolari, il che fa ben sperare per il suo effetto nel trattamento dell'aterosclerosi.

Tutti questi benefici sono accompagnati da una riduzione degli effetti collaterali rispetto alle statine, grazie alla selettività di tessuto. Purtroppo, resta pur sempre un farmaco e la sua assunzione è da correlare ad aumenti dei livelli di acido urico e degli enzimi epatici ALT e AST.

Quindi, tenendo conto dei suoi effetti collaterali, l'acido bempedoico è una molecola che potrà diventare molto utile in terapia, soprattutto nei pazienti intolleranti alle statine e che necessitano per la compliance di un farmaco per via orale. Inoltre, non è detto che ulteriori studi non possano dimostrare la sua efficacia nella regolazione del metabolismo del glucosio, dato il suo effettivo ruolo nel pathway della gluconeogenesi.

Nella maggior parte dei pazienti ad alto ed estremo rischio cardiovascolare è necessaria una terapia in combinazione per raggiungere i livelli ottimali di LDL-C. Questa combinazione è solitamente costituita da ezetimibe e statine, che sono efficaci in circa più del 50% dei casi. Per la restante parte (attorno al 30-35%) è indispensabile aggiungere una terza molecola che attualmente può essere rappresentata dagli inibitori di PCSK9, il cui costo è però un grande limite al loro utilizzo. [53]

L'utilizzo dell'acido bempedoico potrebbe sostituire gli inibitori di PCSK9 in questi casi, soprattutto nei pazienti intolleranti alle statine.

4.3. Inibitori di ANGPTL3

Tutte le terapie viste finora (fatta eccezione per l'afèresi lipoproteica) hanno meccanismi d'azione differenti tra di loro, ma tutti accomunati da una particolare azione, diretta o indiretta: la *down-regulation* del recettore delle LDL. La loro efficacia si può quindi definire dipendente dal corretto funzionamento di LDLR, che purtroppo non è da dare per scontata. Esistono infatti pazienti con delle mutazioni genetiche loss-of-function nei confronti di tale recettore, il cui funzionamento o sintesi sono quindi alterati.

I pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare appartengono a questa casistica, in particolare quelli con la sua variante omozigote. [61]

La FH (Familial Hypercolesterolemia) è una malattia ereditaria a trasmissione autosomica dominante rara, caratterizzata da livelli plasmatici di LDL-C molto elevati rispetto alla norma che portano a morte prematura (entro i 30 anni) se non trattati e a un'elevata incidenza di forme gravi di aterosclerosi oltre che altre malattie cardiovascolari.

La malattia è dovuta nella maggior parte dei casi ad un difetto al recettore epatico per le LDL, fondamentale per l'uptake del colesterolo circolante.

Dunque, è difficile che anche le massime dosi delle terapie viste finora funzionino in questi pazienti, che sono normalmente sottoposti al trattamento con l'afèresi lipoproteica. [29]

Per quanto è stato possibile constatare nel capitolo precedente, l'efficacia dell'afèresi in questo pool di pazienti non è assolutamente annoverabile come terapia ideale, sia per l'invasività della procedura che per l'impegno temporale e psicologico che richiede al paziente. [62] Senza tralasciare le ulteriori complicazioni che l'avvento della COVID-19 ha portato a questi pazienti che per ricevere la terapia dovevano obbligatoriamente recarsi in ospedale.

La necessità di ricerca di un nuovo target per le terapie ipocolesterolemizzanti non si ferma però ai pazienti con HeFH o HoFH: esiste una buona quota di pazienti ad alto rischio cardiovascolare intolleranti alle statine e non responsivi alle altre terapie ipocolesterolemizzanti, per i quali è necessario trovare un'alternativa.

Ecco che è stata intravista la potenzialità di ANGPTL3 (*Angiopietin – Like protein 3*) come nuovo target per il trattamento dell'ipercolesterolemia, fino ad arrivare ad oggi allo sviluppo di un primo farmaco approvato da EMA e FDA.

4.3.1. Funzione e struttura di ANGPTL3

L'*angiopietin – like 3* è una glicoproteina costituita da 460 amminoacidi (PM = 70 kDa) scoperta nel 1999 e appartenente alla famiglia delle *angiopietin – like proteins*, a cui appartengono altre otto proteine come ANGPTL4 e ANGPTL8. Il loro nome deriva dalla loro struttura che è analoga a quella dell'angiopietina anche se non agiscono sui suoi recettori tirosin chinasi endoteliali. È una proteina prodotta esclusivamente a livello epatico in grado di inibire l'azione della lipasi lipoproteica e della lipasi endoteliale. [63]

Il ruolo di ANGPTL3 è stato scoperto in un topo appartenente alla linea murina KK, normalmente caratterizzata da da topi obesi con iperinsulinemia, iperglicemia e iperlipidemia.

In questo topo, rinominato KK/San, è stata notata una riduzione in TC (colesterolo totale) e TG (trigliceridi) poi associata a una mutazione *frameshift* al gene di ANGPTL3 che portava ad un trascritto *nonsense* con conseguente mancata sintesi della proteina.

Somministrando ANGPTL3 al topo questa riusciva a sopperire alla carenza dell'animale, ristabilendo valori di lipidi plasmatici nella norma: questo ha permesso di comprendere il ruolo fondamentale della proteina nel metabolismo lipidico.[64]

Tutte le proteine appartenenti alla famiglia delle ANGPTL sono accomunate da quattro elementi strutturali.

All'estremità N-terminale è sempre presente il peptide segnale di 16 amminoacidi, importante per l'escrezione della proteina e un' α -elica con cui la proteina partecipa all'inibizione della lipasi lipoproteica e della lipasi endoteliale.

All'estremità C-terminale è presente un fibrinogen – like domain, FLD, il cui ruolo è importante nel processo di angiogenesi, oltre a una regione linker che può essere rimossa alterando l'efficacia della proteina. [64]

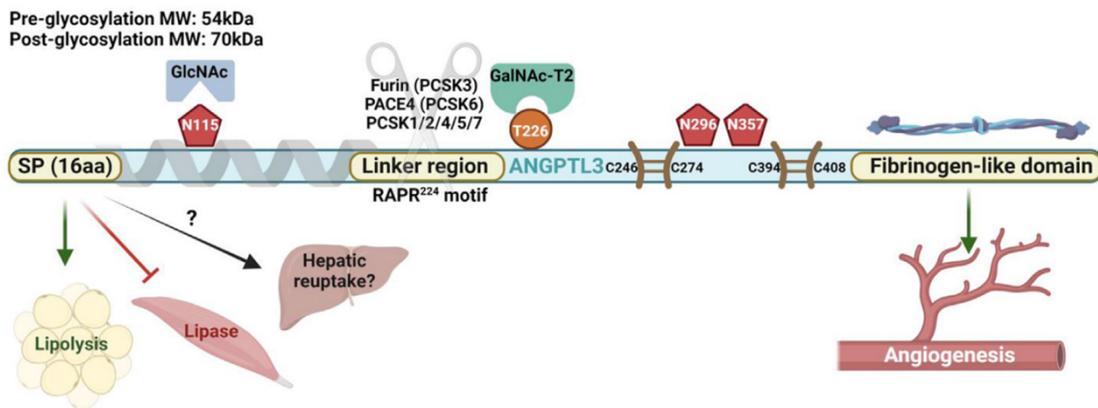


Figura 41. Struttura dell'ANGPTL3. All'estremità N-terminale è presente il peptide segnale in grado di indirizzare la proteina verso il suo sito d'azione. La regione linker può subire il taglio proteolitico con aumento dell'attività proteica da parte di PCSK9 o 6. L'estremità C-terminale è invece caratterizzata da un dominio fibrinogen-like, coinvolto in processi di angiogenesi. [64]

Una volta prodotta, ANGPTL3 può subire delle modifiche post-traduzionali ad opera di diversi enzimi, in grado di rimuovere la regione linker della proteina.

A livello intracellulare la rimozione è condotta dalla furina ovvero PCSK3, mentre al di fuori della cellula è coinvolto PACE 4 (paired amino acid – converting enzyme detto anche PCSK6).

Sembra che l'assenza della regione linker porti ad un aumento dell'attività di ANGPTL3, anche se bisogna ancora capire se la sua rimozione sia indispensabile per l'azione sulle lipasi.

Infatti, può anche essere presente un ostacolo al taglio: la sequenza adiacente alla regione linker può andare incontro a O-glicosilazione per opera della GalNAcT2, la N-acetylgalattosaminyltransferase 2, impedendo la rimozione della regione linker da parte di PCSK3 o 6, rappresentando quindi una sorta di meccanismo regolatorio nei confronti dell'attività di ANGPTL3.[63]

Il meccanismo d'azione di ANGPTL3 in realtà vede coinvolte contemporaneamente anche le altre due proteine ANGPTL8 e 4.

ANGPTL4 è prodotta in diversi tipi cellulari, tra cui epatociti, adipociti e macrofagi, e la sua attività di inibizione di LPL (lipasi lipoproteica) raggiunge il picco massimo durante i periodi di digiuno, al contrario di ANGPTL3 la cui azione è massima durante i pasti. [65]

ANGPTL8 è prodotta dal fegato e dal tessuto adiposo e ha una dimensione minore rispetto alle altre due. Il suo ruolo è quello di promuovere l'azione inibitoria della 3 e attenuare quella della 4.[65]

La lipasi lipoproteica si trova nei capillari dei tessuti adiposo e muscolare ed è un enzima in grado di scindere in acidi grassi liberi e glicerolo i trigliceridi derivati dalle lipoproteine a bassa o molto bassa densità e dai chilomicroni. [1]

La EL (lipasi endoteliale) è invece in grado di metabolizzare le HDL, idrolizzandole.

Sia LPL che EL sono coinvolte nell'idrolisi delle VLDL a VLDL *remnants*.

Per espletare la sua azione ANGPTL3 deve legarsi a formare un complesso con ANGPTL8 che è estremamente più affine a LPL rispetto ad ANGPTL3 da sola. Il complesso ANGPTL3/8 è in grado di inibire la LPL promuovendone la scissione sempre ad opera della furina (PCSK3).[63]

Grazie all'inibizione di LPL, ANGPTL3 riesce a ridurre la clearance delle VLDL e dei chilomicroni (lipoproteine ricche di trigliceridi, TRL) e a promuovere un aumento dei livelli plasmatici di trigliceridi, LDL-C e HDL-C.

Bloccando farmacologicamente l'azione di ANGPT3 è possibile promuovere la lipolisi e ridurre i livelli plasmatici di trigliceridi, LDL-C e HDL-C. [66]

Nel caso dei trigliceridi è da sottolineare come la scoperta di questo nuovo target abbia portato a riscoprire e studiare la correlazione tra i valori plasmatici di trigliceridi e il rischio cardiovascolare. Come abbiamo già potuto constatare, è ampiamente noto come tra le LDL-C e le malattie cardiovascolari esista una correlazione diretta: più alti sono i livelli plasmatici di LDL-C, più alto è il rischio di andare incontro a un MACE (*major adverse cardiovascular event*) o di ASCVD e di conseguenza è importante ridurli con la terapia.

Nonostante ciò, negli ultimi anni si è consolidato sempre di più il possibile ruolo dei trigliceridi, in particolare delle lipoproteine ricche in trigliceridi (TRLs, *triglyceride – rich proteins*) e dei loro *remnants* (letteralmente “resti”), come agenti pro-aterogeni.

Da qui è nata la necessità di studiare più attentamente il loro metabolismo e quindi i vari step di sintesi delle lipoproteine, per poter intervenire anche da questo lato nella lotta contro l'aterosclerosi.

Quindi in futuro, terapie con azione prevalente sui trigliceridi che fino ad oggi sono state considerate marginali nel trattamento di pazienti ad alto rischio cardiovascolare per il loro blando effetto ipocolesterolemizzante potrebbero essere prese nuovamente in considerazione come punto di partenza per nuove terapie concentrate su nuovi target coinvolti nella lipolisi.

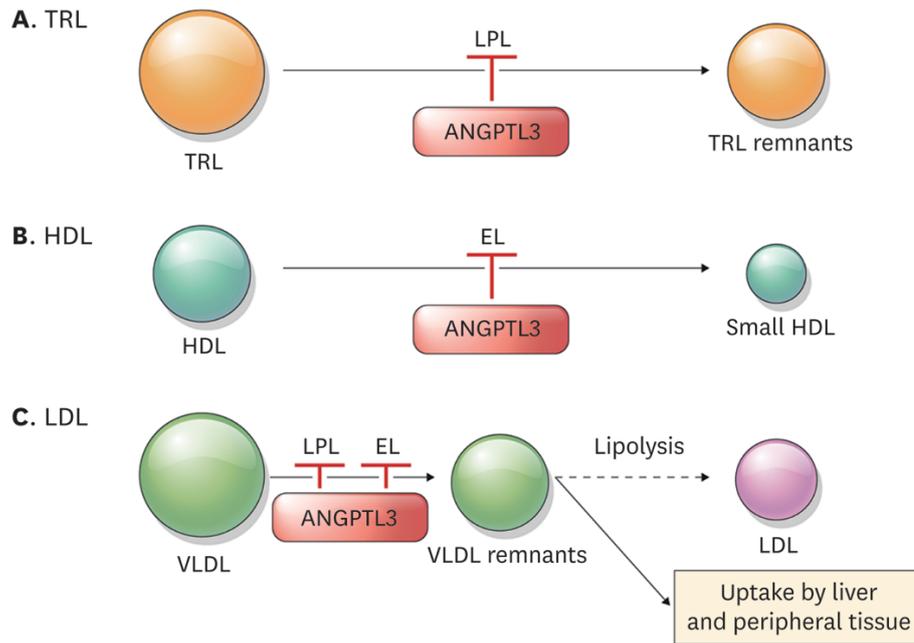


Figura 42. I diversi effetti di ANGPTL3 e della sua inibizione. ANGPTL3 inibisce la LPL causando il blocco del metabolismo delle lipoproteine ricche di trigliceridi (TRL, come le VLDL e i chilomicroni). L'inibizione della EL da parte di ANGPTL3 comporta invece il blocco del metabolismo delle HDL, che non vengono trasformate in piccole HDL. Le LDL invece vengono normalmente sintetizzate a partire dal metabolismo delle VLDL che avviene sia da parte di LPL che da EL, con successiva lipolisi. Nel momento in cui ANGPTL3 viene inibito, tutti questi processi vengono sbloccati con riduzione delle TRL (Triglyceride Rich Lipoproteins), delle HDL e delle LDL (riga tratteggiata indica il processo in atto quando ANGPTL3 è funzionante mentre riga continua quando viene inibito). [66]

Tornando all'aspetto genetico, è stato dimostrato con il sequenziamento degli esoni come pazienti presentanti una mutazione *loss-of-function* al gene dell'ANGPTL3 presentassero effettivamente valori ridotti di trigliceridi e di LDL-C: le mutazioni eterozigoti portavano rispettivamente alla riduzione del 17%-27% e del 9%, mentre le omozigoti del 67% e del 71%. [63]

Il dato fondamentale riguarda però l'incidenza di aterosclerosi nei pazienti con la LOF, che è stata inferiore di circa 40 punti percentuali rispetto a quella nei pazienti senza la mutazione. Questa informazione ha aperto la strada a studi di silenziamento genomico i cui risultati sono attualmente in studio per lo sviluppo di nuove terapie non ancora approvate. [66]

4.3.2. mAb inibitori di ANGPTL3

La prima strategia farmacologica impiegata è altamente specifica e consiste nell'utilizzo degli anticorpi monoclonali come alirocumab ed evolocumab, il cui target è però completamente diverso.

In questo caso, il target della terapia è ANGPTL3 libera nel plasma.

L'unico anticorpo monoclonale attualmente in commercio approvato sia dall'EMA che dall'FDA è evinacumab.

Evinacumab è un anticorpo totalmente umano approvato nel 2021 e primo della sua categoria ad essere utilizzato contro ANGPTL3.

Il suo utilizzo in terapia è stato autorizzato per la riduzione dei livelli plasmatici di LDL-C in pazienti di età superiore ai 12 anni e con ipercolesterolemia familiare omozigote (HoFH), in aggiunta a un adeguato regime dietetico. L'utilizzo di evinacumab pazienti deve essere sempre accompagnato da altre terapie ipocolesterolemizzanti quando tollerate. Infatti, prima di iniziare l'assunzione del farmaco il paziente deve aver raggiunto i valori minimi per lui possibili di LDL-C. [67]

Rispetto ai farmaci visti finora, questa è la differenza più importante: è un farmaco il cui utilizzo è stato autorizzato esclusivamente per la categoria di pazienti con aterosclerosi più grave e valori plasmatici di LDL-C più elevati, ovvero i pazienti con HoFH.

Sicuramente la relativamente recente approvazione e il costo di questo medicinale sono tra le motivazioni per cui questa terapia non è stata estesa ad altre casistiche (tra cui la stessa malattia nella forma meno grave, ovvero la forma eterozigote, che rientra però nelle indicazioni terapeutiche dei farmaci visti finora).

Anche il target del medicinale ha il suo ruolo in questa decisione, essendo un enzima ancora poco studiato, ma la ragione principale di tale scelta è da attribuirsi alla mancata conoscenza del meccanismo d'azione attraverso cui l'inibizione di ANGPTL3 porta alla riduzione del colesterolo plasmatico. [66]

4.3.2.1. Meccanismo d'azione

È noto come l'inibizione di ANGPTL3 porti alla mancata inibizione della lipasi lipoproteica e della lipasi endoteliale, con dirette conseguenze sul metabolismo dei trigliceridi, delle VLDL e delle HDL.

D'altro canto, non è noto il meccanismo attraverso cui l'inibizione di ANGPTL3 porti alla riduzione delle LDL, poiché dagli studi fatti finora non è emerso alcun ruolo di ANGPTL3 nel metabolismo delle LDL. Nonostante ciò, sono state fatte delle ipotesi in merito a tale meccanismo ipocolesterolemizzante derivante dall'inibizione della proteina.

La prima ipotesi riguarda l'aumento dell'attività idrolitica di LPL nei confronti delle VLDL, che porta ad un aumento delle VLDL remnants (precursori delle LDL) che vengono però rapidamente rimosse dal circolo, senza trasformarsi in LDL mediante la lipolisi.

La seconda ipotesi riguarda invece i pazienti in cui il recettore per le LDL non è funzionante e in cui l'inibizione di ANGPTL3 porterebbe ad un effetto ipocolesterolemizzante mediato dalla lipasi endoteliale: l'attività di questo enzima aumenterebbe, modificando la composizione delle VLDL, portando nuovamente a delle VLDL remnants, rimosse dalla circolazione e quindi non disponibili alla sintesi di LDL.

Al contrario, nei pazienti in cui il recettore delle LDL è funzionante, tale recettore potrebbe essere bersaglio di ANGPTL3: l'inibizione di ANGPTL3 potrebbe quindi portare ad un aumento dell'attività dei recettori per le LDL, con aumentato uptake delle LDL circolanti. [63]

Dunque, sul meccanismo d'azione restano ancora dei punti di domanda, ma la sua efficacia come ipocolesterolemizzante è già nota, grazie ai trial clinici condotti in fase di approvazione.

4.3.2.2. Farmacocinetica

La terapia con evinacumab ne prevede la somministrazione ogni quattro settimane attraverso l'infusione endovenosa di 15 mg/kg di farmaco distribuiti in 60 minuti di tempo.[67]

La sua concentrazione massima allo stato stazionario al termine dell'infusione è di 689 +/- 157 mg/L. Sempre allo stato stazionario, la concentrazione minima media di evinacumab nel plasma è di 241 +/- 96,5 mg/L.

Data la natura proteica, il mAb va incontro al metabolismo delle proteine endogene, come le IgG del nostro organismo. [67]

D'altro canto, la sua eliminazione è mediata sia dalla proteolisi che dal suo target ANGPTL3. Rispetto alla proteolisi, la seconda via è saturabile e dunque funzionante solo a basse concentrazioni di mAb. Evinacumab impiega poi 19 settimane circa a ridurre la sua concentrazione plasmatica al di sotto del limite inferiore di rilevamento ovvero 78 ng/mL.[67]

4.3.2.3. Terapia

Nonostante la non proprio recente approvazione, non sono presenti molti studi riguardanti l'efficacia di evinacumab, se non quello di fase III che ha portato alla sua approvazione, a causa della ristretta coorte di pazienti su cui è possibile utilizzare il farmaco. [68]

ELIPSE-HoFH è lo studio di fase tre di riferimento, multicentrico e RTC: è stato condotto su 65 pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare omozigote per valutare la sicurezza e l'efficacia di evinacumab.

I risultati dopo 24 settimane hanno confermato l'efficacia già vista nello studio di fase II, nel quale è stata registrata una riduzione delle LDL-C del 50% circa.

In ELIPSE-HoFH è stata dimostrata una riduzione significativa dei valori di LDL-C da parte di evinacumab sia rispetto ai valori di partenza (-47.1%) che rispetto al placebo (-49%), entrambe con $p < 0.0001$.

Lo stesso traguardo di p-value è stato raggiunto per i trigliceridi (-55.0% rispetto al baseline e -50.4% rispetto al placebo) e per l'ApoB (-41.4% e -49%).[68]

Questi dati ci consentono di confermare le caratteristiche di evinacumab e del suo meccanismo d'azione. È un medicinale il cui effetto è diretto principalmente nei confronti del metabolismo dei trigliceridi ma, al contrario di altre terapie ipotrigliceridemizzanti, presenta una riduzione importante anche del colesterolo LDL.

Altro dato che emerge dal trial è l'effetto significativo di riduzione delle HDL-C, pari a -29.6% rispetto al baseline. [68]

Questo dato è importante è comprensibile, dato l'effetto regolatorio di ANGPTL3 anche sul metabolismo delle HDL. Nonostante la riduzione importante del colesterolo HDL, l'effetto complessivo del farmaco è da ritenersi comunque positivo, in quanto una riduzione delle HDL accompagnata da una riduzione concomitante ed importante delle LDL e dei trigliceridi viene percepita come meno preoccupante, anche se gli studi a lungo termine e sugli outcome cardiovascolari potranno fare più luce sulla questione. [68]

Evinacumab resta quindi un farmaco utile per i pazienti gravi nella riduzione dei valori di LDL-C plasmatici. Nonostante ciò, è poco probabile che il suo utilizzo in terapia venga ampliato a pazienti meno gravi e responsivi alle altre terapie attualmente presenti in commercio. Questo è dovuto sicuramente alla scarsa compliance del farmaco che richiede al paziente di sottoporsi ad infusione endovenosa ogni quattro settimane e anche al suo costo di produzione.

Evinacumab resta comunque un farmaco efficace e sicuro da utilizzare, in quanto non sono stati riportati effetti collaterali gravi se non alcuni casi di reazioni al sito di infusione.

Il suo sviluppo ha consentito di dimostrare l'efficacia clinica di ANGPTL3 come target per altri medicinali ipolipemizzanti sui quali si sta già lavorando, in particolare nell'ottica del silenziamento genico.

4.4. Lomitapide

Come nel caso precedente, anche lomitapide è un medicinale autorizzato in commercio per il trattamento di pazienti affetti da HoFH.[69]

La lomitapide è una molecola organica di sintesi derivata del fluorene, con formula bruta $C_{39}H_{37}F_6N_3O_2$;

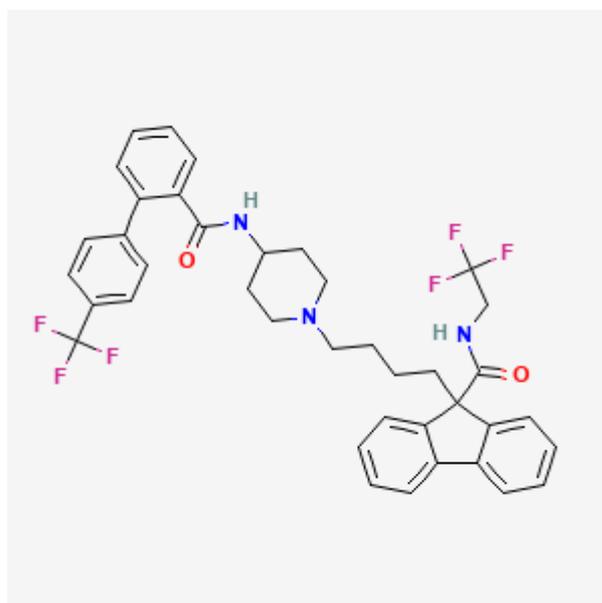


Figura 43. Struttura della molecola di Lomitapide[92]

Il percorso che ha portato allo sviluppo di questo farmaco è partito dallo studio di una malattia molto rara, la abetalipoproteinemia. Questa ha rappresentato un punto di partenza importante per la scoperta di nuovi meccanismi coinvolti nel metabolismo lipidico.

I pazienti affetti da questa patologia ereditaria a trasmissione autosomica recessiva sono soggetti ad ipercolesterolemia ed assenza plasmatica di lipoproteine contenenti l'ApoB.

È stato scoperto che la causa di questa malattia risiede nelle mutazioni *loss-of-function* al gene MTP, che codifica per la proteina MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*), il cui ruolo verrà discusso nel prossimo paragrafo.[70]

4.4.1. Meccanismo d'azione

La lomitapide è un inibitore della *microsomial triglyceride transfer protein*.

La MTP è stata scoperta per la prima volta da Wetterau e Zilversmit nel 1984 come una proteina in grado di velocizzare il trasporto di diversi lipidi attraverso le membrane cellulari. Ulteriori studi hanno permesso di comprenderne la struttura e il ruolo biologico. [71]

È una proteina localizzata all'interno del reticolo endoplasmatico dove svolge il suo ruolo nell'assemblamento delle VLDL (a livello epatico) e dei chilomicroni (negli enterociti).

Nello specifico, la MTP è coinvolta nell'incorporazione dei trigliceridi con l'apolipoproteina B. [71]

La MTP insieme all'ApoB ed altre proteine appartiene alla famiglia delle *large lipid transfer protein*. La struttura terziaria delle proteine di questa famiglia è accomunata dalla presenza di un dominio a barile- β e uno ad α -elica all'estremità N-terminale. In MTP queste due regioni sono coinvolte nell'interazione con l'ApoB, mentre il legame con i lipidi avviene attraverso la regione C-terminale. [71]

La struttura quaternaria di MTP è costituita da due subunità: la subunità MTP dal peso di 97 kDa è costituita da 895 amminoacidi ed è espressa principalmente a livello intestinale ed epatico; la seconda subunità è la PDI (Protein Disulfide Isomerase) che si trova in diversi tipi di cellule, tra cui i miociti cardiaci, le cellule epiteliali, le cellule epiteliali del tubulo renale, le cellule della retina e le cellule immunitarie. [71]

La presenza della subunità PDI, che lega MTP in corrispondenza dell' α -elica non è indispensabile al funzionamento di MTP, anche se, senza PDI la subunità MTP precipita formando degli aggregati insolubili. [71]

La lomitapide inibisce la MTP evitando l'assemblamento dell'ApoB con i trigliceridi. In questo modo si ha una ridotta sintesi di VLDL e di chilomicroni ovvero delle lipoproteine che contengono l'ApoB (100 nel caso della ApoB epatica, 48 nel caso di quella intestinale). [71]

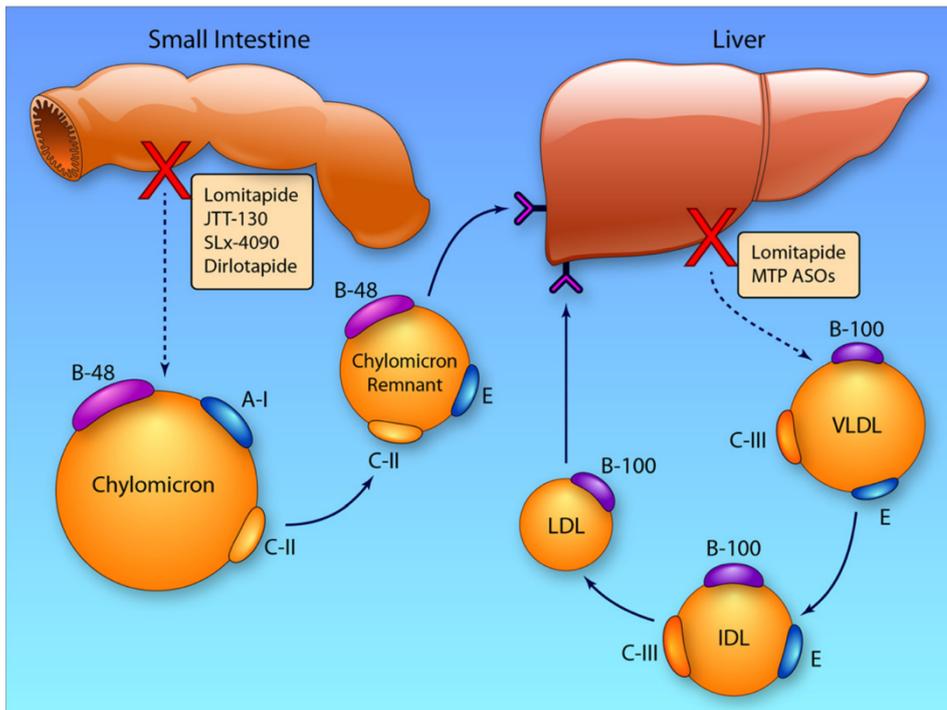


Figura 44. Meccanismo inibitorio di Lomitapide sulla sintesi di VLDL e chilomicroni rispettivamente a livello epatico ed intestinale. [71]

4.4.2. Farmacocinetica

Lomitapide è un farmaco destinato alla somministrazione orale, il che garantisce una buona compliance da parte del paziente. La sua biodisponibilità per os è pari al 7% della dose somministrata a causa di un intenso effetto di primo passaggio.

La C_{max} viene raggiunta dopo 7-8 ore dalla somministrazione e subisce delle variazioni quando il medicinale è somministrato in concomitanza ai pasti. Con un pasto ad alto contenuto di grassi la C_{max} aumenta del 77% mentre l'AUC del 58%. Con un pasto a basso contenuto di grassi questi valori aumentano rispettivamente del 70% e del 28%.

Il tasso di legame alle proteine plasmatiche è superiore al 99.8% ed il volume di distribuzione della lomitapide si attesta ad una media di 1200 L. [69]

Come già accennato, questo farmaco è soggetto a metabolismo epatico da parte del CYP450, in particolare dall'isoforma 3A4 e in minor parte dalle isoforme 1A2, 2B6 e 2C19.

Per questo motivo lomitapide è soggetto ad interazioni con medicinali induttori o inibitori del citocromo P450. Quando somministrato in contemporanea ad un inibitore forte dell'isoforma 3A4 (come il ketoconazolo) l'esposizione a lomitapide aumenta fino a circa 27 volte. [69]

L'emivita di lomitapide è di circa 29 ore. Il farmaco viene eliminato al 93% come tale ed il 33% dei suoi metaboliti viene eliminato con le urine. [69]

4.4.3. Effetti avversi

Nonostante sia stato garantito il suo profilo di sicurezza per l'utilizzo in terapia, lomitapide presenta alcuni effetti collaterali non trascurabili.

Primi tra tutti vi sono gli effetti sul tratto gastrointestinale a causa dei quali il farmaco va sempre assunto almeno due ore dopo aver mangiato. Infatti, la presenza di grassi all'interno del pasto può peggiorare l'effetto del medicinale sulle mucose del tratto GI. [69]

Lomitapide è in grado di aumentare i valori plasmatici di ALT e ASP epatici oltre che indurre steatosi epatica. In realtà, il fatto che questo farmaco induca un accumulo di grassi nel fegato è una diretta e nota conseguenza del suo meccanismo d'azione.

Purtroppo, gli studi clinici disponibili non possono dimostrare effetti a lungo termine sulla funzionalità epatica ma, vedendo gli effetti a livello epatico, la possibilità che lomitapide induca steatoepatite e infine cirrosi non è da escludere. [69]

Nei pazienti in terapia concomitante con statine e lomitapide è stato dimostrato un effetto collaterale indiretto sulla concentrazione plasmatica delle statine.

È stato dimostrato come l'assunzione dei due farmaci in contemporanea porti all'aumento della concentrazione della statina in uso, con conseguente esposizione del paziente a dosi più elevate del farmaco e con maggiore probabilità di comparsa degli effetti collaterali già noti delle statine. Per questo motivo è vietata l'assunzione di dosi di simvastatina superiori a 40 mg durante la terapia con lomitapide. [69]

Lomitapide interagisce anche con gli anticoagulanti cumarinici aumentando l'esposizione del paziente a tali farmaci. Per questo motivo l'INR di questi pazienti va valutato prima dell'assunzione di lomitapide e periodicamente durante il corso della terapia. [69]

4.4.4. Terapia

Lomitapide ha ricevuto l'autorizzazione all'immissione in commercio nel 2013 sia da EMA che da FDA.

Il suo utilizzo è stato approvato nel trattamento di pazienti adulti (>18 anni) con ipercolesterolemia familiare omozigote. Lomitapide deve essere assunto in associazione ad una dieta a ridotto tenore di grassi (il loro apporto energetico giornaliero deve essere inferiore al 20%) ed eventualmente ad altre terapie ipolipemizzanti o ad aferesi lipoproteica. [69]

La dose può variare in base alle necessità e alla risposta del paziente: si parte da un quantitativo minimo pari a 5 mg. Una volta che il paziente ha iniziato la terapia con questo dosaggio si può salire a 10 mg dopo due settimane e successivamente la dose può essere aumentata ogni 4 settimane a 20 mg, 40 mg e 60 mg che è la dose massima approvata in terapia. [69]

Ovviamente l'aumento o la riduzione della dose dipendono sia dal raggiungimento dei valori plasmatici prefissati di LDL che dalla tolleranza del paziente nei confronti degli effetti collaterali. È molto importante aumentare la dose gradualmente per evitare reazioni avverse importanti, soprattutto al tratto gastrointestinale.

È importante che i pazienti in terapia si astengano dall'assunzione di alcool per il benessere epatico e dal succo di pompelmo che è un noto inibitore del CYP3A4. [69]

Nel caso in cui la terapia venga somministrata in concomitanza alle statine, in particolare atorvastatina, è importante distanziare i due medicinali di almeno 12 ore oppure dimezzare la dose di lomitapide (fatta eccezione per quella da 5 mg che non può essere ulteriormente ridotta). [69]

Visti gli effetti collaterali epatici del farmaco, prima di assumerlo è necessario effettuare un check-up epatico con la misurazione di ALT, AST, fosfatasi alcalina, gamma-GT, bilirubina totale e albumina sierica oltre che sottoporsi ad uno screening per steatoepatite.

Quest'ultimo esame va eseguito ogni anno come controllo, mentre la valutazione dei marker epatici va effettuata ad ogni aumento della dose, dopo un anno di terapia e successivamente ogni tre mesi. [69]

Un aspetto interessante e al tempo stesso problematico di questo medicinale riguarda la necessità di integrare determinati nutrienti durante il corso della terapia. Infatti, sono state registrate carenze nell'assorbimento di acidi grassi essenziali e vitamina E, che hanno portato a stabilire un regime prestabilito di integratori alimentari.

I pazienti in terapia con lomitapide devono assumere su base giornaliera integratori di vitamina E per un apporto totale di 400 UI, 200 mg di acido linoleico, 110 mg di EPA (acido eicosopentanoico), 210 mg di ALA (acido alfa-linolenico) e 80 mg di DHA (acido docosaesaenoico). [69]

L'efficacia di lomitapide è stata dimostrata da studi clinici di fase III, sempre condotti su pazienti di età pari o superiore ai 18 anni. Gli studi sono stati condotti solo su soggetti con ipercolesterolemia familiare omozigote, restringendo la numerosità del campione e limitando futuri studi sugli outcome cardiovascolari di questa terapia. [69]

Uno studio clinico di fase III *open-label* ha valutato l'efficacia di lomitapide nel ridurre i valori di LDL-C in 29 pazienti con HoFH.

Le prime valutazioni sono state fatte dopo 26 settimane durante le quali i pazienti erano sottoposti a terapia con lomitapide (da 5 mg fino a 60 mg in base alla tolleranza del singolo paziente) e altre terapie ipolipemizzanti che non potevano essere modificate.

La riduzione mediana di LDL-C è stata del 50% rispetto all'inizio del trial. La riduzione dei livelli di ApoB è stata invece del 49%. [72]

Dopo le 78 settimane totali del trial la riduzione di questi due valori è stata mantenuta pressoché costante: la riduzione dei valori di LDL-C nei 23 pazienti rimasti alla fine dello studio è stata del 38% rispetto al baseline.

Lo studio è stato poi esteso con questi 23 pazienti per un totale di 294 settimane.

Alla settimana 246 erano rimasti 19 pazienti, 14 dei quali avevano raggiunto almeno una volta valori di LDL-C inferiori a 100 mg/dL e 11 pazienti al di sotto dei 70 mg/dL. Questo risultato è estremamente positivo, a maggior ragione tenendo conto del quadro clinico di questi pazienti. [72]

Durante questo studio è stato possibile riscontrare tutti gli effetti collaterali già descritti nel paragrafo precedente, tra cui l'accumulo di grasso a livello del fegato.

Nonostante ciò, non è stato riscontrato alcun tipo di patologia epatica insorta nei pazienti a causa del medicinale. Inoltre, l'incidenza di effetti collaterali nella fase di estensione del trial è stata del 42.1%, inferiore rispetto a quella riscontrata nelle 78 settimane di trial clinico, pari all'84.2%.

Questo dato ha permesso di rimarcare un'ipotesi già emersa in merito a lomitapide ovvero il fatto che gli effetti collaterali indotti da questo medicinale possano ridurre la loro comparsa ed entità con il tempo. [72]

Un altro studio clinico di fase III giapponese è stato condotto su nove pazienti sempre con HoFH. La riduzione media dei livelli plasmatici di LDL-C è stata del 42%.

Sei pazienti su nove hanno raggiunto valori di LDL-C inferiori a 100 mg/dL.

I risultati di questo trial sono quindi in linea con quelli del precedente, anche in merito agli effetti collaterali registrati.

Quello che è possibile evincere dagli studi è che lomitapide è un farmaco efficace nella riduzione dei valori plasmatici di LDL-C, consentendo alla maggioranza dei pazienti il raggiungimento di concentrazioni plasmatiche inferiori ai 100 mg/dL. [72]

Questo effetto non è attribuibile al solo trattamento con aferesi lipoproteica poiché questa pratica è in grado di ridurre i valori di LDL plasmatici ma non ha alcun effetto sul tasso di secrezione dell'ApoB dal fegato o sul catabolismo delle LDL.

L'effetto farmacologico di lomitapide è diverso rispetto a quello dell'aferesi lipoproteica ma anche rispetto a quello di statine, ezetimibe e inibitori della PCSK9 che sono attualmente le terapie più utilizzate nel trattamento dell'ipercolesterolemia e dell'aterosclerosi: questo garantisce un futuro promettente di azione sinergica delle tre terapie, ove necessario. [71]

In seguito all'approvazione di lomitapide esclusivamente per pazienti con HoFH, la ricerca di coorti numerose su cui portare avanti studi clinici post-marketing per valutare l'efficacia e la sicurezza a lungo termine oltre che gli outcome cardiovascolari è molto difficile.

Un aspetto importante e positivo da ricordare è che l'utilizzo del farmaco nel mondo reale ne causa anche la modifica della posologia rispetto agli studi clinici. Se nello studio clinico la dose viene aumentata a prescindere (fino alla comparsa dei primi effetti collaterali) per vedere fino a che punto arriva l'efficacia del farmaco, nel mondo reale la dose viene aumentata in base alle necessità fino a quando il paziente raggiunge i valori di LDL-C auspicati.

Essendo un farmaco molto efficace, non c'è bisogno di raggiungere le dosi più elevate per ottenere la riduzione desiderata dei valori di LDL-C, quindi all'atto pratico lomitapide viene utilizzato nel mondo reale a dosi inferiori rispetto a quelle utilizzate negli studi clinici.

La diretta conseguenza di questo è la riduzione nella pratica clinica degli effetti collaterali di lomitapide, che si è dimostrato essere molto più tollerabile. [73]

In Italia è stata valutata la coorte di pazienti più ampia finora in un *real-world setting*. I 15 pazienti hanno assunto lomitapide per 6 mesi o più insieme ad altre terapie ipolipemizzanti. Con una dose media di lomitapide di 19 mg/die la riduzione media dei livelli di LDL-C è stata del 68% senza nessun effetto sui marker epatici e senza nessuna interruzione di terapia da parte dei pazienti. [72]

I dati disponibili in merito agli outcome cardiovascolari riguardano solo singoli pazienti la cui storia clinica è stata valutata per trarre conclusioni in generale.

Un caso di letteratura riguarda una paziente di 52 anni, seguita per più di 10 anni nella sua lotta contro l'HoFH.

Durante la sua vita ha assunto statine (atorvastatina e rosuvastatina alle dosi massime) per 13 anni ed ezetimibe 10 mg/die per 9 anni, senza mai raggiungere livelli ottimali di LDL-C, ma nemmeno ridotti, dato che la sua concentrazione plasmatica media di LDL-C era di 755 mg/dL.

Il coinvolgimento in uno studio di fase III con lomitapide le ha permesso di ridurre i valori di LDL-C del 68.3% (da 658 al baseline a 205 mg/dL), aprendo la strada a un netto miglioramento del suo quadro clinico verificatosi negli anni a seguire.

Nel 2015 la terapia in associazione è stata implementata con l'utilizzo di un quarto farmaco: evinacumab. L'effetto complessivo di lomitapide ed evinacumab ha portato ad una riduzione di più del 90% dei livelli di LDL-C della donna, con un valore medio della concentrazione plasmatica pari a 34.80 mg/dL, cambiandole la vita.[74]

La riduzione dei livelli plasmatici di LDL-C non è stato l'unico obiettivo ad essere stato raggiunto con questi due farmaci.

In primis il loro utilizzo in combinazione ha portato alla regressione degli xantomi tendinei preesistenti e degli xantelasmi presenti in entrambi gli occhi. [74]



Figura 45. Fotografie a testimonianza dell'avvenuta regressione degli xantelasmi in seguito ai diversi regimi terapeutici. La fotografia del 2015 rappresenta la regressione dopo 6 anni dall'aggiunta di lomitapide mentre quella del 2020 dopo 5 anni dall'aggiunta di evinacumab. [74]

Anche le placche carotidee sono regredite in modo apprezzabile già in seguito alla terapia con lomitapide, portando a una regressione complessiva del 35.6%. [74]

Questi traguardi sono stati raggiunti con un rapporto rischio/beneficio apprezzabile, che consente di guardare positivamente sia gli effetti di lomitapide nel mondo reale che la sua efficacia in terapia con evinacumab.

Lomitapide resta un farmaco utile in terapia, per pazienti gravi e non responsivi ad altre terapie attualmente autorizzate, soprattutto per il suo meccanismo d'azione alternativo e non dipendente dalla funzionalità del recettore delle LDL.

Nonostante ciò, non si può dire che abbia effetti collaterali trascurabili, soprattutto a livello epatico. Inoltre, la necessità di assumere contemporaneamente integratori alimentari e le importanti interazioni farmacologiche con altri principi attivi in grado di regolare l'attività del CYP450 non lo rendono una terapia di facile assunzione, riducendo la compliance e mettendo il paziente a rischio di incorrere in problemi per scarsa attenzione alle interazioni.

È stata notata una riduzione della frequenza dell'afèresi in alcuni pazienti partecipanti degli studi di fase III, anche se lomitapide non va considerato come un'alternativa equivalente all'afèresi lipoproteica.

La tecnica di AL non è solo in grado di ridurre le concentrazioni plasmatiche di ApoB100-LDL ma anche quelle della Lp(a) e di altre molecole coinvolte nei processi infiammatori, portando dei benefici che non sono stati ancora valutati per lomitapide. [72]

Quindi, l'utilizzo di lomitapide come alternativa ad altre terapie ipocolesterolemizzanti non è attualmente considerato se non per pazienti ad alto rischio. È importante valutare il suo possibile impiego in associazione in pazienti gravi per ridurre la frequenza dell'afèresi lipoproteica, aumentando la qualità della vita del paziente e riducendo i costi che l'AL richiede. [71]

4.5. Volanesorsen

È ad oggi ampiamente dimostrato come valori elevati di trigliceridi rappresentino un aumentato rischio di malattie cardiovascolari.

Purtroppo, nei pazienti con aterosclerosi o ipercolesterolemia l'approccio terapeutico utilizzato non si è ancora adattato a questa nuova evidenza scientifica. Le terapie utilizzate per il trattamento dell'aterosclerosi si concentrano sulla riduzione delle LDL-C con ottimi risultati, lasciando però

il paziente esposto ad un rischio residuale di eventi cardiovascolari che non si è ancora riusciti ad eliminare.

Il rischio residuale è dovuto a fattori esterni rispetto ai livelli plasmatici di LDL-C, tra cui i trigliceridi.

Dunque, dopo essere riusciti a sviluppare molecole efficaci nel raggiungimento dei livelli ottimali di LDL-C la ricerca ha iniziato a concentrarsi su altre molecole, la cui azione farmacologica possa contribuire in modo diverso nella riduzione del rischio di eventi cardiovascolari.

Volasenorsen è un oligonucleotide antisenso (ASO) utilizzato nel silenziamento del gene codificante per ApoC-III ovvero APOC3.

Gli oligonucleotidi antisenso insieme ai siRNA già trattati rappresentano una nuova tipologia di approccio terapeutico nell'ottica del silenziamento genico.

Gli ASO sono delle brevi sequenze nucleotidiche a singolo filamento di DNA o RNA.

La funzione dell'ASO è di riconoscere la sequenza complementare di mRNA bloccando la traduzione proteica in due modi: per azione dell'RNAsi H1 oppure mediante ingombro sterico.

[75]

Il primo meccanismo prevede che l'ASO si leghi alla sequenza di mRNA complementare formando un ibrido DNA-RNA che viene riconosciuto dall'RNAsi H1 (enzima appartenente alla famiglia delle endonucleasi). Questo enzima è in grado di riparare il danno ovvero la presenza dell'ibrido degradando esclusivamente il filamento di RNA.

Il secondo meccanismo prevede che il legame dell'ASO all'mRNA complementare impedisca al ribosoma di legarsi (evitando il legame di una delle due subunità, 40S o 60S, o di entrambe) oppure eviti, nonostante il legame del ribosoma, lo scorrimento del ribosoma lungo il filamento di mRNA.

Esiste poi un terzo meccanismo ASO mediato che vede l'inibizione del processo di splicing dell'mRNA. Infatti, il pre-mRNA presente a livello nucleare non è ancora maturo e deve essere processato con la rimozione degli introni. Il legame dell'ASO al pre-mRNA ostacola il processo di maturazione dell'mRNA, sempre grazie all'ingombro sterico. [75]

Dunque, un meccanismo è di tipo degradativo mentre gli altri due si basano sull'ingombro sterico.

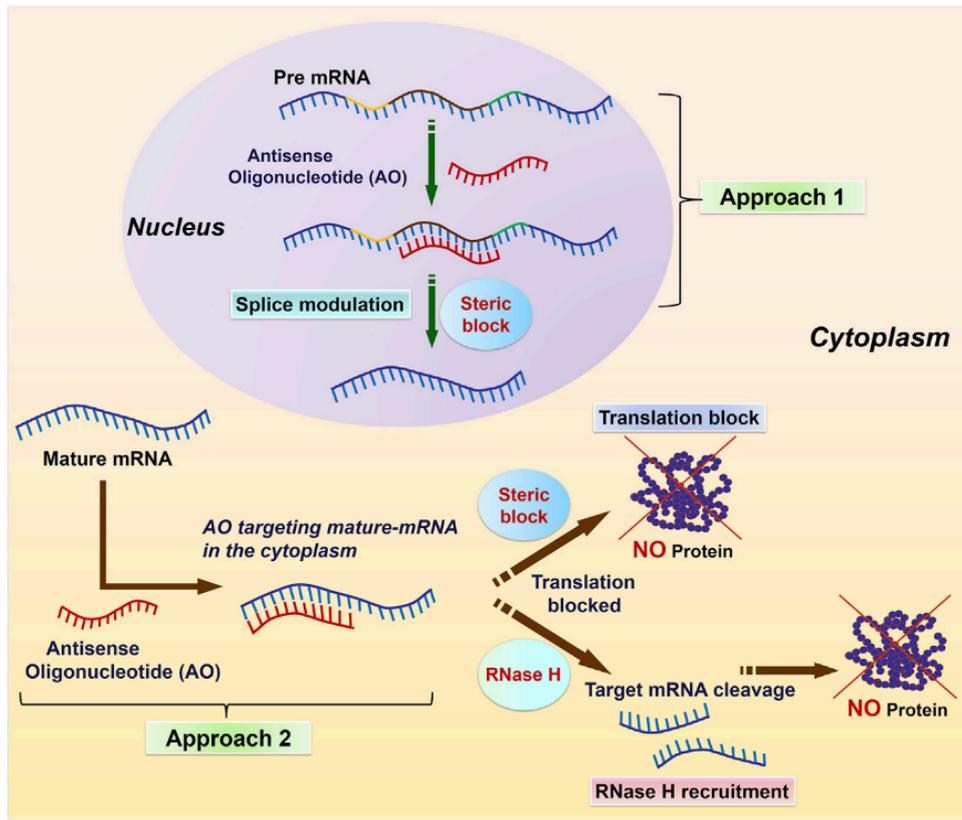


Figura 46. Meccanismo d'azione degli oligonucleotidi antisenso. [74]

La struttura nativa degli ASO è soggetta all'azione delle nucleasi e questo li rende molecole altamente instabili in vivo. È stato quindi necessario intervenire per migliorare la performance del medicinale nel nostro organismo.

Per la protezione nei confronti delle nucleasi, l'intervento praticato è quello di sostituzione del legame fosfodiesterico con un legame fosforotioato: questa modifica comporta maggiore stabilità alla degradazione in vivo e conseguente aumento dell'emivita plasmatica.

Altre modifiche frequenti riguardano lo zucchero, che può essere funzionalizzato in posizione 2', per esempio con gruppi metilici e metossietilici oppure sostituendo direttamente l'ossidrilico con un atomo di fluoro. Con queste modifiche si riesce ad ottenere una maggiore affinità per la sequenza complementare di mRNA con conseguente miglioramento della posologia. [75]

Come è già stato trattato nel caso dei siRNA, anche per gli ASO l'ingresso a livello cellulare è ostacolato dalla loro natura idrofila. Anche gli ASO sono sottoposti a strategie di delivery alternative come nanoparticelle, liposomi oppure l'utilizzo dell'uptake mediato dall'endocitosi. In questo ultimo caso l'ASO viene coniugato con un anticorpo il cui antigene è un recettore di membrana.

Nonostante i promettenti sviluppi di queste tecniche di delivery, resta ancora ampiamente praticata la somministrazione degli ASO direttamente nel tessuto target, soprattutto a livello vitreale. [75]

Tra tutti gli ASO sviluppati sono state create con il tempo tre diverse generazioni di nucleotidi antisense, caratterizzate da un crescente miglioramento delle caratteristiche farmacocinetiche e di affinità.

Volanesorsen appartiene alla seconda generazione di ASO che sono fosforotioati e modificati in posizione 2' con sostituenti alchilici. Nello specifico volanesorsen presenta la funzionalizzazione in 2' con un metossietile (2'-O-ME).

Come già detto, l'aggiunta di questi gruppi ingombranti aumenta l'affinità per l'mRNA, rendendo l'ASO costituito da un singolo filamento di DNA più simile all'RNA. [76]

4.5.1. Meccanismo d'azione

Volanesorsen è diretto contro l'mRNA codificante per ApoC-III con meccanismo mediato da RNAsi H1.

Questo ASO è in grado di formare un ibrido DNA-RNA legandosi in modo complementare al filamento di mRNA codificante per ApoC-III. L'ibrido viene riconosciuto come aberrante dall'RNAsi H1 che interviene degradando in modo selettivo il filamento di mRNA necessario per la sintesi della proteina. [77]

ApoC-III è una glicoproteina di 79 aminoacidi (PM = 8.8 kDa) la cui scoperta risale al 1969 opera di Brown et al.

La sua sintesi avviene principalmente a livello epatico ma in minor quota anche a livello intestinale.

Questa proteina è coinvolta nel metabolismo lipidico in diversi modi come l'inibizione della lipoproteina lipasi (come ANGPTL3) e della lipasi epatica; [77]

Nella sua struttura sono presenti sei α -eliche alifatiche in grado di interagire con i lipidi.

Il suo ruolo nel metabolismo dei trigliceridi è stato studiato a fondo, in particolare nei soggetti affetti da ipertrigliceridemia. È stato dimostrato come questi pazienti tendano ad avere livelli di ApoC-III superiori fino a tre volte rispetto ai soggetti sani nei quali il valore medio di ApoC-III plasmatica è di 8-10 mg/dL. [77]

ApoC-III è coinvolta nel metabolismo delle proteine ricche di trigliceridi (TRLs) grazie al suo coinvolgimento in tre pathway principali.

Il primo riguarda l'inibizione degli enzimi LPL e HL, con conseguente riduzione dell'interazione tra questi enzimi e le TRLs che restano circolanti.

A livello epatico ApoC III è in grado di ostacolare il legame di ApoE ed ApoB al recettore per le LDL e alla LRP1 (low-density Lipoprotein-Related Protein 1) riducendo la clearance delle TRLs circolanti. Inoltre, è in grado di aumentare la sintesi e il rilascio di VLDL da parte del fegato. [66]

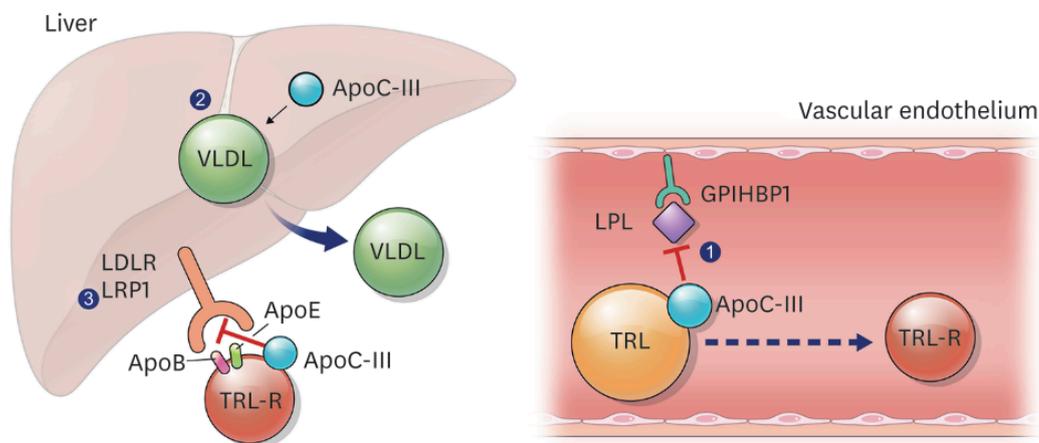


Figura 47. Effetti dell'ApoC-III sul metabolismo lipidico. A livello endoteliale l'ApoC-III inibisce l'azione della LPL, bloccando l'idrolisi dei trigliceridi delle TRL ed evitandone quindi la conversione in TRL-remnants. A livello epatico l'ApoC-III promuove il rilascio di VLDL ed evita l'uptake delle TRL-remnants ostacolando l'interazione tra ApoB e ApoE con LDLR o LRP1. [66]

Per quanto riguarda il suo coinvolgimento nella malattia aterosclerotica, sono state dimostrate molte evidenze in merito al suo effetto sullo stato della patologia.

L'ApoC-III è in grado di promuovere l'adesione endoteliale dei monociti e di promuovere la proliferazione di cellule muscolari lisce.

Il meccanismo di promozione dell'adesione avviene mediante attivazione di PKC β (Protein Kinase C beta) e NF-kB (Nuclear Factor-kB) che inducono un aumento dell'espressione di VCAM-1 (Molecola di Adesione Cellulare Vascolare) e ICAM-1 (Molecola di Adesione Cellulare Intercellulare 1). [77]

ApoC-III è anche coinvolta nella regolazione della coagulazione.

Uno studio ha dimostrato un'associazione tra elevata sintesi di piastrine e livelli elevati di ApoC-III. Inoltre, l'assunzione di volanesorsen (inibitore di ApoC-III) ha indotto stati di trombocitopenia nei pazienti, rendendo ancora più plausibile la correlazione tra ApoC-III e la sintesi di piastrine. [77]

Un'altra evidenza del suo ruolo nell'aterosclerosi riguarda la capacità di ApoC-III di promuovere l'interazione tra LDL e proteoglicani situati sulle pareti delle arterie.

Il meccanismo alla base di questo evento sta in una modifica nella composizione delle LDL. Quando le LDL sono costituite da ApoC-III e ApoB in rapporto elevato (dunque un maggiore contenuto di ApoC-III) il loro contenuto in colesterolo non esterificato, sfingomieline e ceramidi è ridotto.

Il ridotto contenuto di queste molecole rende la particella di LDL molto più fluida, consentendo all'ApoB presente di disporsi in maniera alternativa e favorevole per l'interazione con i proteoglicani.

Oltretutto l'ApoC-III è in grado di attivare degli enzimi presenti a livello endoteliale (come la sfingomielinasi) che promuovono l'idrolisi delle LDL. Per questo motivo LDL ricche in ApoC-III sono molto più suscettibili a questa azione. [77]

È stato inoltre dimostrato come una mutazione LOF al gene APOC3 porti ad un ridotto rischio di malattia coronaria e ischemia, riconoscendo il ruolo della proteina nel benessere cardiovascolare.[77]

Quindi, gli effetti metabolici di ApoC-III comportano l'aumento dei trigliceridi plasmatici e delle proteine ricche di trigliceridi (TRLs). Inoltre, l'ApoC-III promuove il rilascio di VLDL e l'innescò di processi infiammatori pro-aterogenici oltre che pro-coagulanti.

La sua inibizione da parte di volanesorsen è essenziale nella riduzione di livelli plasmatici elevati di trigliceridi oltre che, dal punto di vista teorico, nella riduzione del rischio cardiovascolare residuo. Va infatti ricordato come i suoi effetti sugli eventi cardiovascolari non siano ancora stati indagati da alcun trial clinico.

4.5.2. Farmacocinetica

Volanesorsen è un medicinale destinato alla somministrazione sottocutanea.

Il tempo necessario per raggiungere la C_{max} è di 2-4 ore, con un'emivita plasmatica superiore alle due settimane (tra gli 11.7 e i 31.2 giorni).

Il legame con le proteine plasmatiche è superiore al 98% con un volume di distribuzione pari a 330 L. [78]

La biotrasformazione di volanesorsen non è mediata dal CYP ma dalle endonucleasi tissutali. Il prodotto del suo metabolismo sono degli oligonucleotidi ancora più brevi che vengono poi metabolizzati dalle esonucleasi.

Per questo motivo volanesorsen non è soggetto ad alcun tipo di interazione con inibitori e induttori del CYP. [78]

Non è nemmeno substrato della glicoproteina P o dei polipeptidi trasportatori di anioni organici 1B1 e 1B3. [79]

L'eliminazione di volanesorsen e dei suoi metaboliti avviene principalmente attraverso le urine.[78]

4.5.3. Effetti Avversi

Durante i trial clinici condotti per questo medicinale è stato possibile identificare tre principali effetti collaterali dipendenti dall'utilizzo del farmaco.

Il primo effetto collaterale è ricorrente nei medicinali iniettabili e consiste nelle reazioni al sito di iniezione. Queste reazioni si sono verificate nel 79% dei pazienti in terapia durante lo studio APPROACH che verrà discusso nel prossimo paragrafo. [80]

Il secondo evento avverso riguarda l'immunogenicità di volanesorsen: alla fine di un trattamento di 6 mesi il 16% dei pazienti ha dato positività al test per gli anticorpi antifarmaco mentre dopo 12 mesi di trattamento è risultato positivo il 3%, senza però dimostrare alcun tipo di conseguenza in merito alla sicurezza del medicinale. [78]

L'effetto avverso più preoccupante riguarda l'avvento di trombocitopenia in seguito a terapia con volanesorsen.

Durante lo studio di fase III APPROACH, il 76% dei pazienti trattati ha dimostrato una riduzione della conta piastrinica inferiore a $140 \times 10^9/L$ al contrario del 24% dei pazienti nel gruppo placebo. Il 48% dei pazienti trattati ha raggiunto livelli inferiori a $100 \times 10^9/L$ al contrario del gruppo placebo dove nessun soggetto ha raggiunto tale soglia. [80]

Questo effetto collaterale ha avuto delle ripercussioni sulla terapia e sul monitoraggio dei pazienti descritte nel prossimo paragrafo.

4.5.4. Terapia

Volasenorsen ha ricevuto l'approvazione da parte dell'EMA nel 2019. L'agenzia ha ritenuto questo medicinale utile in terapia, nonostante gli effetti collaterali di non scarsa entità.[78]

Il suo utilizzo è destinato esclusivamente a pazienti con sindrome chilomicronemica familiare (FCS) e ad alto rischio di pancreatite, in associazione ad una dieta adeguata. [79]

La terapia con volasenorsen richiede un monitoraggio della conta piastrinica ogni due settimane dall'inizio del trattamento. Questa va valutata anche prima di iniziare la terapia: è necessario che il valore misurato sia superiore a $140 \times 10^9/L$. Se il valore è inferiore, è possibile effettuare una seconda valutazione. Nel caso in cui anche la seconda misurazione non superasse il valore di soglia il paziente non potrà accedere alla terapia. [79]

I pazienti in terapia devono sottoporsi ad una prima iniezione preconstituita, contenente 285 mg di principio attivo. La somministrazione deve essere poi ripetuta una volta ogni settimana per tre mesi. In seguito a questo periodo, la frequenza di somministrazione va ridotta a una volta ogni due settimane.

Se il paziente dopo tre mesi non ha raggiunto una riduzione dei valori di trigliceridi superiore o uguale al 25% o superiori o uguali a 22,6 mmol/L, vi è l'obbligo di interrompere la terapia. [79]

Gli studi di fase III condotti su volanesorsen sono i seguenti: APPROACH, COMPASS e APPROACH OLE (Open Label Extension). [78]

Lo studio APPROACH è uno studio di fase III, randomizzato e con doppio-cieco della durata di 52 settimane. I soggetti coinvolti nello studio sono pazienti affetti da FCS.

I risultati hanno dimostrato una riduzione statisticamente significativa dei livelli di trigliceridi a digiuno dopo tre mesi di terapia, pari in media a -76.5% rispetto ai valori iniziali. Anche la differenza di riduzione rispetto al placebo (in cui i trigliceridi sono aumentati in media di +17.6%) è stata significativa e pari a -94.1%.

Alla fine dello studio la significatività nella riduzione dei trigliceridi è stata conservata nel gruppo trattato, con una media di riduzione pari a -50.1%. [80]

Anche i risultati dello studio COMPASS sono stati positivi.

È uno studio di fase III randomizzato e con doppio cieco. I pazienti reclutati erano soggetti con ipertrigliceridemia grave (valore di trigliceridi a digiuno superiore o uguale a 500 mg/dL) o FCS.

Dopo tre mesi dalla randomizzazione la riduzione media dei valori di trigliceridi plasmatici è stata del 71.2% per il gruppo trattato, al contrario del placebo dove i valori di trigliceridi si sono ridotti in media dello 0.9%.

Un aspetto interessante di questo studio riguarda i livelli plasmatici delle LDL nei pazienti arruolati.

L'utilizzo di volanesorsen ha causato un aumento di tali valori pur riducendo allo stesso tempo il colesterolo non-HDL, indice di diverse lipoproteine pro-aterogeniche. Questo comporta la possibile necessità di associare una terapia ipocolesterolemizzante come le statine all'utilizzo di volanesorsen, anche se la riduzione in colesterolo non-HDL ed il fatto che le ApoB rimangano inalterate con questo farmaco è un indice positivo per l'effetto sulle molecole aterogeniche.[81]

Nello studio APPROACH OLE è stato poi possibile includere sia i pazienti dello studio APPROACH che quelli dello studio COMPASS.

Dopo tre mesi, i pazienti dello studio APPROACH hanno ridotto in media i valori di trigliceridi a digiuno del -49.2%, mentre quelli dello studio COMPASS del -64.9%, portando in entrambi casi a risultati statisticamente significativi. Dopo 12 mesi di studio open label i valori medi di riduzione dei trigliceridi sono stati rispettivamente del -35.1% e -39.9%.[78]

Volanesorsen è quindi un medicinale utile nel trattamento di stati di ipertigliceridemia gravi, soprattutto in pazienti dove altre terapie con azione sui trigliceridi non hanno alcun tipo di effetto. Nonostante la sua approvazione il suo effetto sulla conta piastrinica resta comunque un suo punto a sfavore e il motivo per il quale l'FDA non ha conferito l'AIC al medicinale.

L'intento con la trattazione di questo medicinale con effetto ipotrigliceridemizzante e non ipocolesterolemizzante è quello di rendere note le nuove frontiere nel trattamento dell'aterosclerosi, con nuovi target e nuovi approcci terapeutici.

Anche la European Atherosclerosis Society ha rilasciato nel 2021 un *consensus statement* nel quale mette in evidenza il ruolo delle TRL e dei loro remnants nella malattia aterosclerotica cardiovascolare.

In particolare, è stato dimostrato come il metabolismo delle TRL porti alla sintesi delle TRL remnants che hanno un diametro inferiore ai 70 nm. Come le VLDL, le IDL e le LDL, queste particelle di ridotte dimensioni sono in grado di penetrare l'endotelio e di accumularsi nelle pareti delle arterie. L'accumulo derivante da un'elevata concentrazione di TRL supporta l'inizio della lesione aterosclerotica e la sua progressione.

Ecco che il ruolo dell'ApoC-III nel metabolismo delle TRL risulta essere il target perfetto: con la sua inibizione viene promossa una clearance di queste particelle con conseguente clearance dei trigliceridi. [82]

CONCLUSIONI

Il trattamento farmacologico dell'aterosclerosi ha visto notevoli sviluppi negli ultimi vent'anni, con l'applicazione delle biotecnologie mediche.

Il paziente aterosclerotico necessita di interventi cronici atti a migliorare non solo la progressione delle placche ateromatose ma anche il suo stile di vita, spesso causa della patologia e del suo aggravarsi.

Le statine restano al giorno d'oggi la soluzione più utilizzata grazie alla loro efficacia. La scelta delle statine come gold standard in terapia per la prevenzione primaria e secondaria di eventi cardiovascolari in pazienti con alti livelli di LDL-C risiede inoltre in altre due loro caratteristiche: la via di somministrazione ed il costo.

La somministrazione orale e il metabolismo queste molecole sono ampiamente conosciuti da medico e paziente migliorando la compliance nell'impiego di tale farmaco, nonostante i noti effetti collaterali. È tuttavia possibile intervenire sul regime terapeutico optando per l'utilizzo di statine ad alta intensità (secondo la classificazione trattata nel paragrafo 3.1.2.) a dosaggi inferiori oppure per la terapia in associazione con altri ipocolesterolemizzanti, che consente una riduzione della dose.

Il costo di questi medicinali è ammortizzato dalla facile sintesi delle molecole e dalla presenza sul mercato di numerosi medicinali equivalenti.

Infatti, ezetimibe e resine restano terapie d'appoggio alle statine, sempre di facile utilizzo da parte del paziente. È interessante nel caso delle resine l'aumentata compliance da parte dei pazienti pediatrici, grazie alla forma farmaceutica e al loro effetto locale.

Le nuove terapie introdotte in commercio a partire dal 2015 sono delle valide alternative in termini di efficacia alle terapie sopracitate, soprattutto in casi di non responsività alle terapie standard o di scarsa tolleranza agli effetti collaterali dei principi attivi.

Gli anticorpi monoclonali e i siRNA inibitori di PCSK9 sono i più utilizzati, grazie all'assenza di effetti collaterali importanti e alla grande efficacia come ipocolesterolemizzanti. Sono solitamente impiegati per la prevenzione secondaria e in associazione a statine o ad altri ipolipemizzanti, per ottenere la massima efficacia clinica. Rispetto agli anticorpi monoclonali, inclisiran ha come vantaggio la somministrazione semestrale che garantisce una migliore compliance da parte del paziente.

L'acido bempedoico si è dimostrato essere una buona alternativa all'utilizzo degli inibitori di PCSK9 grazie alla sua via di somministrazione e alla sua efficacia clinica. Il vantaggio principale dell'acido bempedoico risiede nella sua via di sintesi, molto più economica rispetto ad anticorpi monoclonali e siRNA. Per quanto non comporti reazioni avverse a livello muscolare come le statine, questa molecola presenta purtroppo effetti collaterali non trascurabili a livello epatico e sui livelli plasmatici di acido urico.

Il problema delle terapie citate finora risiede nel loro meccanismo d'azione che dipende dalla presenza di recettori per le LDL funzionanti: per ovviare questo ostacolo sono stati studiati e testati nuovi farmaci in grado di agire anche in pazienti refrattari alle terapie LDLR-dipendenti.

Evinacumab è un anticorpo monoclonale con azione LDLR-indipendente, il che lo rende utile nel trattamento dell'aterosclerosi in pazienti non responsivi alle altre terapie. Infatti, è stato approvato esclusivamente per pazienti con HoFH.

Anche Lomitapide è approvato per l'uso esclusivo da parte di pazienti con HoFH e viene visto come un'alternativa meno costosa e di più facile somministrazione rispetto ad evinacumab. Il problema in questo caso risiede nei suoi effetti collaterali, principalmente gastrointestinali ed epatici, oltre che alla sua capacità di interazione con altri medicinali.

Il vantaggio di lomitapide riguarda il suo utilizzo in pazienti in aferesi lipoproteica che potrebbero beneficiare di questa molecola in termini di riduzione della frequenza del trattamento di depurazione del sangue.

Volanesorsen è un ASO con azione specifica nei confronti della riduzione dei trigliceridi plasmatici.

Infatti, è ormai noto come i trigliceridi oltre al colesterolo rappresentino un fattore di rischio molto importante per la ASCVD e di conseguenza è fondamentale considerare le terapie efficaci nella loro riduzione.

In conclusione, nessuna di queste terapie innovative è effettivamente considerata sufficientemente superiore in termini di efficacia, costi, effetti avversi e compliance alle statine da poterle sostituire nel trattamento dell'ipercolesterolemia. Il loro impiego è tuttavia considerato utile nei casi di grave intolleranza o farmacoresistenza alle terapie di prima scelta.

Le statine restano quindi la terapia principale per i pazienti ad alto rischio di incorrere in malattie cardiovascolari (prevenzione primaria), eventualmente associate all'ezetimibe.

Per la prevenzione secondaria, ovvero per i pazienti già affetti da patologie cardiovascolari, l'approccio terapeutico stabilito dalle linee guida americane ed europee consiste in una terapia di

associazione con statine ed ezetimibe oppure una tripla associazione con un mAb inibitore di PCSK9.

Come è stato possibile comprendere soprattutto nei casi più gravi l'approccio terapeutico più diffuso è l'associazione, nel tentativo di affrontare la patologia da diversi punti.

Oltretutto la plasmafèresi extracorporea resta insostituibile. Questo trattamento resta tutt'oggi essenziale per i casi più gravi di ipercolesterolemia (FH) ed aterosclerosi, nonostante la sua invasività.

La speranza per il futuro è che anche i pazienti più gravi e refrattari alle terapie già in commercio possano trovare la terapia più adatta alla loro condizione. Tutto ciò senza dover compromettere la loro qualità della vita per una terapia cronica che dovrebbe non solo essere efficace, ma idealmente anche poco gravosa sulla vita di tutti i giorni.

Bibliografia

- [1] Nelson; David L. and M. M. Cox, *I principi di biochimica di Lehninger*, 6th Edition. Zanichelli Editore, 2014.
- [2] “Topic 22 Diabetes and dyslipidemia.” [Online]. Available: https://l11nutrition.com/mod_l11/TOPIC22/old_version/m221.htm
- [3] K. Alwaili, K. Alrasadi, Z. Awan, and J. Genest, “Approach to the diagnosis and management of lipoprotein disorders,” *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, vol. 16, no. 2, pp. 132–140, Apr. 2009, doi: 10.1097/MED.0b013e328329135a.
- [4] A. Gilman, L. S. Goodman, L. L. Brunton, R. Hilal-Dandan, and B. C. Knollmann, *Goodman & Gilman’s Pharmaceutical Basis of Therapeutics*, 13th edition. Zanichelli Editore, 2019.
- [5] Kevin Fo, “Chapter 9 Lipid Metabolism | BS2003: Biochemistry II.” [Online]. Available: <https://bookdown.org/jcog196013/BS2003/lipid-metabolism.html>
- [6] V. F. Roche, S. W. Zito, T. L. Lemke, and W. David A., *Principi di Chimica Farmaceutica*, 7^a Edizione Italiana. Piccin, 2020.
- [7] “Very Low Density Lipoprotein.” [Online]. Available: https://flexikon.doccheck.com/de/Very_Low_Density_Lipoprotein
- [8] P. Libby *et al.*, “Atherosclerosis,” *Nat Rev Dis Primers*, vol. 5, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41572-019-0106-z.
- [9] G. M. Pontieri, F. Mainiero, R. Misasi, and M. Sorice, *Patologia generale e fisiopatologia generale*, VI., vol. II. Piccin Nuova Libreria S.p.A., 2019.
- [10] S. Jebari-Benslaiman *et al.*, “Pathophysiology of Atherosclerosis,” *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 6, p. 3346, Mar. 2022, doi: 10.3390/ijms23063346.
- [11] “Differenza tra arterie, vene, capillari, arteriole e venule.” [Online]. Available: <https://medicinaonline.co/2017/01/23/differenza-tra-arterie-vene-capillari-arteriole-e-venule/>
- [12] M. A. Seidman, R. N. Mitchell, and J. R. Stone, “Pathophysiology of Atherosclerosis,” in *Cellular and Molecular Pathobiology of Cardiovascular Disease*, Elsevier, 2014, pp. 221–237. doi: 10.1016/B978-0-12-405206-2.00012-0.
- [13] “Colesterolo e ipercolesterolemia - epiCentro.iss.it.” [Online]. Available: [Colesterolo e ipercolesterolemia - epiCentro.iss.it](http://epicentro.iss.it)
- [14] S. S. Gidding *et al.*, “The Agenda for Familial Hypercholesterolemia: A Scientific Statement from the American Heart Association,” *Circulation*, vol. 132, no. 22, pp. 2167–2192, Dec. 2015, doi: 10.1161/CIR.0000000000000297.

- [15] A. A. Kumar *et al.*, “Acute myocardial infarction in an 18 year old South Indian girl with familial hypercholesterolemia: a case report,” *Cases J*, vol. 1, no. 1, p. 71, Dec. 2008, doi: 10.1186/1757-1626-1-71.
- [16] P. H. Jones *et al.*, “Comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin across doses (STELLAR* Trial),” *Am J Cardiol*, vol. 92, no. 2, pp. 152–60, Jul. 2003, doi: 10.1016/s0002-9149(03)00530-7.
- [17] Y.-J. Lee *et al.*, “Moderate-intensity statin with ezetimibe vs. high-intensity statin in patients with diabetes and atherosclerotic cardiovascular disease in the RACING trial,” *Eur Heart J*, vol. 44, no. 11, pp. 972–983, Mar. 2023, doi: 10.1093/eurheartj/ehac709.
- [18] A. J. Nelson *et al.*, “High-Intensity Statin Use Among Patients With Atherosclerosis in the U.S.,” *J Am Coll Cardiol*, vol. 79, no. 18, pp. 1802–1813, May 2022, doi: 10.1016/j.jacc.2022.02.048.
- [19] L. Jia, J. L. Betters, and L. Yu, “Niemann-pick C1-like 1 (NPC1L1) protein in intestinal and hepatic cholesterol transport,” *Annu Rev Physiol*, vol. 73, no. 1, pp. 239–59, Mar. 2011, doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142233.
- [20] S. Kobayashi, “The Effect of Polyphenols on Hypercholesterolemia through Inhibiting the Transport and Expression of Niemann-Pick C1-Like 1,” *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 19, p. 4939, Oct. 2019, doi: 10.3390/ijms20194939.
- [21] K. Tsujita *et al.*, “Impact of Dual Lipid-Lowering Strategy With Ezetimibe and Atorvastatin on Coronary Plaque Regression in Patients With Percutaneous Coronary Intervention The Multicenter Randomized Controlled PRECISE-IVUS Trial,” 2015.
- [22] M. Davidson, “The efficacy of colesvelam HCl in the treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia in pediatric and adult patients,” *Clin Ther*, vol. 35, no. 8, pp. 1247–52, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.clinthera.2013.06.014.
- [23] C. M. Ballantyne, E. Miller, and R. Chitra, “Efficacy and Safety of Rosuvastatin Alone and in Combination with Cholestyramine in Patients with Severe Hypercholesterolemia: A Randomized, Open-Label, Multicenter Trial,” 2004.
- [24] M. Puato *et al.*, “Atorvastatin reduces macrophage accumulation in atherosclerotic plaques: a comparison of a nonstatin-based regimen in patients undergoing carotid endarterectomy,” *Stroke*, vol. 41, no. 6, pp. 1163–8, Jun. 2010, doi: 10.1161/STROKEAHA.110.580811.
- [25] S. Tonstad, M. Sivertsen, and S. Tonstad, “Low dose colestipol in adolescents with familial hypercholesterolaemia,” 1996.
- [26] M. Davidson, “The efficacy of colesvelam HCl in the treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia in pediatric and adult patients,” *Clin Ther*, vol. 35, no. 8, pp. 1247–52, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.clinthera.2013.06.014.

- [27] M. J. McQueen *et al.*, “Articles Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins as risk markers of myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): a case-control study.” [Online]. Available: www.thelancet.com
- [28] D. Daga Ruiz, F. Fonseca San Miguel, F. J. González de Molina, A. Úbeda-Iglesias, A. Navas Pérez, and R. Jannone Forés, “Plasmapheresis and other extracorporeal filtration techniques in critical patients.,” *Med Intensiva*, vol. 41, no. 3, pp. 174–187, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.medin.2016.10.005.
- [29] W. P. Lee, B. N. Datta, B. Ong, A. Rees, and J. Halcox, “Defining the Role of Lipoprotein Apheresis in the Management of Familial Hypercholesterolemia.”
- [30] K. R. Feingold, *Lipoprotein Apheresis*. 2000. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26780007>
- [31] G. R. Thompson *et al.*, “Efficacy criteria and cholesterol targets for LDL apheresis.,” *Atherosclerosis*, vol. 208, no. 2, pp. 317–21, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.06.010.
- [32] G. R. Thompson, “The scientific basis and future of lipoprotein apheresis,” *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, vol. 26, no. 1, pp. 32–36, Feb. 2022, doi: 10.1111/1744-9987.13716.
- [33] M. J. Koziolk *et al.*, “Retrospective analysis of long-term lipid apheresis at a single center.,” *Ther Apher Dial*, vol. 14, no. 2, pp. 143–52, Apr. 2010, doi: 10.1111/j.1744-9987.2009.00747.x.
- [34] N. G. Seidah and A. Prat, “The Multifaceted Biology of PCSK9.,” *Endocr Rev*, vol. 43, no. 3, pp. 558–582, May 2022, doi: 10.1210/endrev/bnab035.
- [35] L. Da Dalt and G. D. Norata, “FISIOPATOLOGIA DELL’ATEROSCLEROSI PCSK9 OLTRE IL FEGATO: FOCUS SU PANCREAS, CUORE E SISTEMA NERVOSO PCSK9 beyond the liver: focus on Pancreas, Heart and Nervous System,” 2021.
- [36] “Riassunto delle caratteristiche del prodotto Praluent.” [Online]. Available: https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_005884_044500_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113
- [37] “Riassunto delle caratteristiche del prodotto Repatha.” [Online]. Available: https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_002317_044317_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113
- [38] B. Gencer *et al.*, “Cognition After Lowering LDL-Cholesterol With Evolocumab.,” *J Am Coll Cardiol*, vol. 75, no. 18, pp. 2283–2293, May 2020, doi: 10.1016/j.jacc.2020.03.039.
- [39] G. G. Schwartz *et al.*, “Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome,” *New England Journal of Medicine*, vol. 379, no. 22, pp. 2097–2107, Nov. 2018, doi: 10.1056/NEJMoa1801174.

- [40] M. L. O'Donoghue *et al.*, "Long-Term Evolocumab in Patients With Established Atherosclerotic Cardiovascular Disease.," *Circulation*, vol. 146, no. 15, pp. 1109–1119, Oct. 2022, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.122.061620.
- [41] S. J. Nicholls *et al.*, "Effect of Evolocumab on Coronary Plaque Phenotype and Burden in Statin-Treated Patients Following Myocardial Infarction," *JACC Cardiovasc Imaging*, vol. 15, no. 7, pp. 1308–1321, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.jcmg.2022.03.002.
- [42] W. Alshaer *et al.*, "siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches.," *Eur J Pharmacol*, vol. 905, p. 174178, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174178.
- [43] R. W. Carthew and E. J. Sontheimer, "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs.," *Cell*, vol. 136, no. 4, pp. 642–55, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.01.035.
- [44] K. Gavrilov and W. M. Saltzman, "Therapeutic siRNA: Principles, challenges, and strategies," 2012.
- [45] J. K. Watts, G. F. Deleavey, and M. J. Damha, "Chemically modified siRNA: tools and applications.," *Drug Discov Today*, vol. 13, no. 19–20, pp. 842–55, Oct. 2008, doi: 10.1016/j.drudis.2008.05.007.
- [46] E. Samuel, M. Watford, U. O. Egolum, D. N. Ombengi, H. Ling, and D. W. Cates, "Inclisiran: A First-in-Class siRNA Therapy for Lowering Low-Density Lipoprotein Cholesterol.," *Ann Pharmacother*, vol. 57, no. 3, pp. 317–324, Mar. 2023, doi: 10.1177/10600280221105169.
- [47] Y. N. Lamb, "Inclisiran: First Approval.," *Drugs*, vol. 81, no. 3, pp. 389–395, Feb. 2021, doi: 10.1007/s40265-021-01473-6.
- [48] A. Pirillo and A. L. Catapano, "Inclisiran: How Widely and When Should We Use It?," *Curr Atheroscler Rep*, vol. 24, no. 10, pp. 803–811, Oct. 2022, doi: 10.1007/s11883-022-01056-0.
- [49] J. Hardy *et al.*, "A Critical Review of the Efficacy and Safety of Inclisiran.," *Am J Cardiovasc Drugs*, vol. 21, no. 6, pp. 629–642, Nov. 2021, doi: 10.1007/s40256-021-00477-7.
- [50] "ORION-4." [Online]. Available: <https://www.orion4trial.org/homepage-uk>
- [51] "ORION-8", [Online]. Available: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03814187>
- [52] "Colesterolo e Ipercolesterolemia." [Online]. Available: <https://www.epicentro.iss.it/colesterolo/#:~:text=Valori%20desiderabili%20sono%20i%20seguenti,inferiore%20a%2050%20mg%2Fdl>.
- [53] M. Ruscica, C. R. Sirtori, S. Carugo, M. Banach, and A. Corsini, "Bempedoic Acid: for Whom and When," *Curr Atheroscler Rep*, vol. 24, no. 10, pp. 791–801, Oct. 2022, doi: 10.1007/s11883-022-01054-2.

- [54] D. C. Oniciu and J. L. Myers, "Bempedoic Acid and the Fraudulent Fatty Acid Family: The Gold Rush to Cardiovascular Therapies in the New Millennium," *Org Process Res Dev*, vol. 25, no. 3, pp. 365–372, Mar. 2021, doi: 10.1021/acs.oprd.0c00501.
- [55] C. Granchi, "ATP citrate lyase (ACLY) inhibitors: An anti-cancer strategy at the crossroads of glucose and lipid metabolism," *Eur J Med Chem*, vol. 157, pp. 1276–1291, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.ejmech.2018.09.001.
- [56] K. A. Kim and H.-J. Park, "New Therapeutic Approaches to the Treatment of Dyslipidemia 2: LDL-C and Lp(a)," *J Lipid Atheroscler*, vol. 12, no. 1, p. 37, Jan. 2023, doi: 10.12997/jla.2023.12.1.37.
- [57] A. Markham, "Bempedoic Acid: First Approval," *Drugs*, vol. 80, no. 7, pp. 747–753, May 2020, doi: 10.1007/s40265-020-01308-w.
- [58] "RCP Nustendi." [Online]. Available: https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_000707_048668_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113
- [59] J. S. Parham and A. C. Goldberg, "Review of recent clinical trials and their impact on the treatment of hypercholesterolemia," *Prog Cardiovasc Dis*, vol. 75, pp. 90–96, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.pcad.2022.11.011.
- [60] S. E. Nissen *et al.*, "Bempedoic Acid and Cardiovascular Outcomes in Statin-Intolerant Patients," *New England Journal of Medicine*, vol. 388, no. 15, pp. 1353–1364, Apr. 2023, doi: 10.1056/NEJMoa2215024.
- [61] I. Shamsudeen, B. W. McCrindle, and R. A. Hegele, "Treatment of Homozygous Familial Hypercholesterolemia With ANGPTL3 Inhibitor, Evinacumab," *JCEM Case Reports*, vol. 1, no. 3, May 2023, doi: 10.1210/jcemcr/luad058.
- [62] M. Cuchel *et al.*, "2023 Update on European Atherosclerosis Society Consensus Statement on Homozygous Familial Hypercholesterolaemia: new treatments and clinical guidance," *Eur Heart J*, vol. 44, no. 25, pp. 2277–2291, Jul. 2023, doi: 10.1093/eurheartj/ehad197.
- [63] F. Mohamed, B. S. Mansfield, and F. J. Raal, "ANGPTL3 as a Drug Target in Hyperlipidemia and Atherosclerosis," *Curr Atheroscler Rep*, vol. 24, no. 12, pp. 959–967, Dec. 2022, doi: 10.1007/s11883-022-01071-1.
- [64] K. H. Burks, D. Basu, I. J. Goldberg, and N. O. Stitzel, "Angiopoietin-like 3: An important protein in regulating lipoprotein levels," *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, vol. 37, no. 3, p. 101688, May 2023, doi: 10.1016/j.beem.2022.101688.
- [65] S. Kersten, "ANGPTL3 as therapeutic target," *Curr Opin Lipidol*, vol. 32, no. 6, pp. 335–341, Dec. 2021, doi: 10.1097/MOL.0000000000000789.
- [66] J. Y. Kim and N. H. Kim, "New Therapeutic Approaches to the Treatment of Dyslipidemia 1: ApoC-III and ANGPTL3," *J Lipid Atheroscler*, vol. 12, no. 1, p. 23, Jan. 2023, doi: 10.12997/jla.2023.12.1.23.

- [67] “RCP Evkeeza.” [Online]. Available: https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_004424_049619_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113
- [68] F. J. Raal *et al.*, “Evinacumab for Homozygous Familial Hypercholesterolemia,” *New England Journal of Medicine*, vol. 383, no. 8, pp. 711–720, Aug. 2020, doi: 10.1056/NEJMoa2004215.
- [69] “RCP Lojuxta.” [Online]. Available: https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_003957_042920_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113
- [70] D. J. Rader and J. J. P. Kastelein, “Lomitapide and Mipomersen,” *Circulation*, vol. 129, no. 9, pp. 1022–1032, Mar. 2014, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001292.
- [71] A. J. Hooper, J. R. Burnett, and G. F. Watts, “Contemporary Aspects of the Biology and Therapeutic Regulation of the Microsomal Triglyceride Transfer Protein,” *Circ Res*, vol. 116, no. 1, pp. 193–205, Jan. 2015, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304637.
- [72] C. Stefanutti, “Lomitapide—a Microsomal Triglyceride Transfer Protein Inhibitor for Homozygous Familial Hypercholesterolemia,” *Curr Atheroscler Rep*, vol. 22, no. 8, p. 38, Aug. 2020, doi: 10.1007/s11883-020-00858-4.
- [73] M. D. Panno, A. B. Cefalù, and M. R. Averna, “Lomitapide: a novel drug for homozygous familial hypercholesterolemia,” *Clin Lipidol*, vol. 9, no. 1, pp. 19–32, Feb. 2014, doi: 10.2217/clp.13.74.
- [74] E. Khoury, A. Lauzière, F. J. Raal, J. Mancini, and D. Gaudet, “Atherosclerotic plaque regression in homozygous familial hypercholesterolaemia: a case report of a long-term lipid-lowering therapy involving LDL-receptor-independent mechanisms,” *Eur Heart J Case Rep*, vol. 7, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1093/ehjcr/ytad029.
- [75] B. T. Le, P. Raguraman, T. R. Kosbar, S. Fletcher, S. D. Wilton, and R. N. Veedu, “Antisense Oligonucleotides Targeting Angiogenic Factors as Potential Cancer Therapeutics,” *Mol Ther Nucleic Acids*, vol. 14, pp. 142–157, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.omtn.2018.11.007.
- [76] M. Mansoor and A. J. Melendez, “Medicine-Immunology, Infection and Inflammation,” 2008.
- [77] L. D’Erasmus, A. Di Costanzo, A. Gallo, E. Bruckert, and M. Arca, “ApoCIII: A multifaceted protein in cardiometabolic disease,” *Metabolism*, vol. 113, p. 154395, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.metabol.2020.154395.
- [78] J. Paik and S. Duggan, “Volanesorsen: First Global Approval,” *Drugs*, vol. 79, no. 12, pp. 1349–1354, Aug. 2019, doi: 10.1007/s40265-019-01168-z.

- [79] “RCP Waylivra.” [Online]. Available: https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_005052_047941_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113
- [80] J. L. Witztum *et al.*, “Volanesorsen and Triglyceride Levels in Familial Chylomicronemia Syndrome,” *New England Journal of Medicine*, vol. 381, no. 6, pp. 531–542, Aug. 2019, doi: 10.1056/NEJMo1715944.
- [81] I. Gouni-Berthold *et al.*, “Efficacy and safety of volanesorsen in patients with multifactorial chylomicronaemia (COMPASS): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial,” *Lancet Diabetes Endocrinol*, vol. 9, no. 5, pp. 264–275, May 2021, doi: 10.1016/S2213-8587(21)00046-2.
- [82] “Recent advances in treating hypertriglyceridemia in patients at high risk of cardiovascular disease with apolipoprotein C-III inhibitors”.
- [83] V. Kumar, A. K. Abbas, and J. C. Aster, *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*, 9th ed. Elsevier, 2014.
- [84] B. Sadowitz, K. G. Maier, and V. Gahtan, “Basic science review: Statin therapy--Part I: The pleiotropic effects of statins in cardiovascular disease.,” *Vasc Endovascular Surg*, vol. 44, no. 4, pp. 241–51, May 2010, doi: 10.1177/1538574410362922.
- [85] “PubChem Compound Summary for CID 150311, Ezetimibe.” [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ezetimibe>
- [86] A. B. Weinglass *et al.*, “Extracellular loop C of NPC1L1 is important for binding to ezetimibe,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 32, pp. 11140–11145, Aug. 2008, doi: 10.1073/pnas.0800936105.
- [87] “PubChem Compound Summary for CID 10140, Glycocholic acid.” [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10140>
- [88] “PubChem Compound Summary for CID 6675, Taurocholic acid,” 2023, [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6675>
- [89] T. McCormack, R. Dent, and M. Blagden, “Very low LDL-C levels may safely provide additional clinical cardiovascular benefit: the evidence to date,” *Int J Clin Pract*, vol. 70, no. 11, pp. 886–897, Nov. 2016, doi: 10.1111/ijcp.12881.
- [90] N. S., M. A., and E. L., “Structure - Functions Relations in Small Interfering RNAs,” in *Practical Applications in Biomedical Engineering*, InTech, 2013. doi: 10.5772/53945.
- [91] A. Khvorova, “Oligonucleotide Therapeutics — A New Class of Cholesterol-Lowering Drugs,” *New England Journal of Medicine*, vol. 376, no. 1, pp. 4–7, Jan. 2017, doi: 10.1056/NEJMp1614154.
- [92] “Lomitapide.” [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lomitapide>