



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

**INIBIZIONE DELLA TIROSINA CHINASI DI BRUTON COME
PROMETTENTE TERAPIA NELLA SCLEROSI MULTIPLA**

RELATORE: CHIAR.MA PROF.SSA ADRIANA CHILIN

LAUREANDO: PAOLO CONCINA

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

INTRODUZIONE	1
1. SCLEROSI MULTIPLA COME PATOLOGIA AUTOIMMUNE	3
1.1 Ruolo del sistema immunitario a difesa dell'organismo	4
1.2 Sistema immunitario innato e sistema immunitario adattativo	5
1.3 Linfociti B e immunità anticorpo-mediata	8
1.4 Linfociti T e immunità cellulo-mediata	10
1.5 Presentazione dell'antigene ai linfociti T	12
2. SISTEMA NERVOSO CENTRALE E SCLEROSI MULTIPLA	14
2.1 Neuroni	14
2.2 Comunicazione tra neuroni	16
2.3 Cellule gliali	17
2.4 Oligodendrociti	18
2.5 Cellule della microglia	20
3. FISIOPATOLOGIA DELLA SCLEROSI MULTIPLA	22
3.1 Cause	24
3.2 Forme	25
4. SINTOMATOLOGIA	28
4.1 Fatica	28
4.2 Dolore	28
4.3 Spasticità	29
4.4 Disturbi visivi	29
4.5 Disturbi della sensibilità	31
4.6 Disturbi vescicali	32
4.7 Disturbi cognitivi	32
4.8 Disturbi sessuali	33
4.9 Disturbi della coordinazione	34
4.10 Disturbi del linguaggio	34
4.11 Depressione	35
4.12 Disturbi intestinali	35
4.13 Sintomi meno comuni	36
5. TERAPIE CONSOLIDATE	37
5.1 Terapie d'attacco	38
5.2 Disease-modulatory therapies	38
5.3 Interferone	40
5.4 Glatiramer acetato	41

5.5 Teriflunomide.....	42
5.6 Dimetilfumarato.....	43
5.7 Natalizumab.....	44
5.8 Modulatore dei recettori della sfingosina 1-fosfato.....	45
5.9 Anti-CD52.....	47
5.10 Anti-CD20.....	48
5.11 Cladribina.....	50
5.12 Mitoxantrone.....	50
5.13 Off-label.....	51
6. CHINASI.....	53
6.1 Classificazione.....	54
6.2 Struttura.....	54
6.3 Attivazione protein-chinasi.....	58
7. TEC FAMILY.....	60
7.1 BTK come chinasi Tec.....	60
7.2 Attivazione famiglia Tec.....	61
7.3 Struttura famiglia Tec.....	62
8. BTK.....	66
8.1 Storia.....	66
8.2 Struttura.....	67
8.3 Espressione di BTK.....	67
8.4 B Cell Receptor.....	69
8.5 Reclutamento e attivazione di BTK.....	69
8.6 Funzioni di BTK non correlate al recettore BCR.....	72
8.7 Regolazione di BTK.....	74
9. INIBITORI DI BTK.....	76
9.1 Effetti dell'inibizione di BTK.....	77
9.2 Classificazione.....	78
9.3 Vantaggi.....	79
9.4 Limitazioni.....	80
9.5 Meccanismo d'azione.....	80
9.6 Inibitori irreversibili.....	82
9.7 Inibitori reversibili.....	83
9.8 Sicurezza e tollerabilità.....	84
9.9 Potenza ed efficacia.....	84
9.10 Fenebrutinib.....	85
9.11 Orelabrutinib.....	86

<i>9.12 Remibrutinib</i>	86
<i>9.13 Evobrutinib</i>	87
<i>9.14 Tolebrutinib</i>	88
10. CONCLUSIONI	94
APPENDICE	96
BIBLIOGRAFIA DELLE IMMAGINI	100
BIBLIOGRAFIA	105

INTRODUZIONE

La sclerosi multipla (MS) rappresenta la più comune patologia infiammatoria del sistema nervoso centrale negli adulti tra i 20 e i 40 anni. Colpisce circa 2,8 milioni di persone nel mondo, con una prevalenza nei continenti europeo ed americano settentrionale.

Le cause che portano allo sviluppo della malattia non sono del tutto chiare, ma sembra esserci una correlazione con fattori ambientali come il virus di Epstein-Barr (EBV) e/o livelli bassi di vitamina D e fattori genetici, come la presenza del cromosoma XX, che giustifica un'incidenza della patologia superiore nelle donne rispetto agli uomini (rapporto di 3:1).

L'infiammazione a livello del SNC è scatenata da un'attivazione esagerata ed inopportuna del sistema immunitario, che riconosce come estranei elementi in realtà sicuri ed essenziali nel mantenere una corretta funzionalità neuronale. Tutto ciò porta ad infiammazione a livello centrale con danno agli assoni, processi di demielinizzazione e trasmissione interrotta del segnale, che determina lo sviluppo di sintomi e ricadute tipiche del disturbo.

Il seguente elaborato pone l'attenzione, in primo luogo, sui componenti del sistema immunitario e i ruoli fondamentali che esercitano nella difesa dell'organismo. Successivamente si concentra sulla descrizione della sclerosi multipla come patologia autoimmune, richiamando le cause possibili, i sintomi che la caratterizzano e le forme nelle quali si può classificare in base all'andamento della malattia. Prosegue poi con un'analisi dei trattamenti farmacologici approvati nel corso degli anni, focalizzandosi sul meccanismo d'azione delle molecole e sul rallentamento della progressione della patologia. Termina, infine, con un'attenta ricerca delle funzioni della tirosina chinasi di Bruton (BTK), proteina fondamentale nei processi di sviluppo, proliferazione e differenziazione dei linfociti B, cellule immunitarie critiche nella fisiopatologia della sclerosi multipla. Le vie di trasduzione del segnale che BTK gestisce portano all'attivazione e al rilascio di importanti fattori di trascrizione.

La mia trattazione pone il focus sugli inibitori di chinasi come Tolebrutinib ed Evobrutinib, terapie ancora oggi in sperimentazione e monitorate tramite svariati studi di fase III. Questi piccoli inibitori di BTK hanno registrato effetti incoraggianti sulle lesioni cerebrali attraverso gli studi di fase II già conclusi. I vantaggi che potrebbero rendere questi farmaci innovativi nel trattamento della sclerosi multipla sono la loro elevata selettività assieme alla capacità di attraversare la barriera ematoencefalica (BEE), potendo agire direttamente nel SNC, a livello delle cellule immunitarie che esprimono la chinasi di Bruton.

1. SCLEROSI MULTIPLA COME PATOLOGIA AUTOIMMUNE

Un sistema immunitario che funziona correttamente ha il fondamentale compito di proteggere l'organismo da ciò che arriva dall'esterno e rappresenta una minaccia. In condizioni normali, infatti, le difese immunitarie reagiscono solo contro le molecole pericolose per l'organismo, attuando una serie di meccanismi difensivi che ne permettono l'eliminazione. Le strutture che costituiscono l'organismo sono invece riconosciute come proprie dalle cellule del sistema immunitario e, come tali, non vengono attaccate, bensì protette. I meccanismi di "tolleranza immunologica" permettono al sistema immunitario di distinguere gli elementi "self" da quelli "non-self", impedendo l'attivazione dei linfociti contro le molecole considerate sicure.

Quando però il sistema immunitario fallisce e non riconosce come sicure le proprie componenti, innesca una serie di meccanismi diretti contro l'organismo stesso, che, come conseguenza, porta alla generazione di stati patologici veri e propri: le **malattie autoimmuni**. Quest'ultime sono dette organo-specifiche se portano alla produzione di reazioni autoimmuni contro antigeni specifici di un organo, sistemiche se sono dovute a reazioni autoimmuni contro antigeni localizzati a livello di qualsiasi organo o apparato. Un terzo tipo è rappresentato dalle malattie autoimmuni che interessano principalmente un organo ma possono generare autoanticorpi circolanti, i quali riconoscono antigeni self non necessariamente specifici per l'organo colpito.

Per poter etichettare un disturbo come autoimmune è necessario rispettare alcuni criteri:

- deve verificarsi una risposta immunitaria ad un autoantigene specifico
- i livelli di autoanticorpi prodotti seguono l'andamento della malattia
- i linfociti T reagiscono al rilascio di auto-antigeni isolati
- viene provocata l'attivazione dei linfociti B

Questi requisiti ribadiscono nuovamente la base dello sviluppo di una patologia autoimmune, ovvero l'attivazione del sistema immunitario contro elementi "self" dell'organismo. ¹

Nella **sclerosi multipla** l'attivazione inopportuna del sistema immunitario avviene a livello del sistema nervoso centrale, provocando così infiammazione cronica, che prosegue durante il corso della patologia autoimmune. La reazione avversa da parte delle cellule deputate alla difesa si sviluppa all'interno della barriera ematoencefalica, più precisamente sulla superficie dei neuroni, portando al cosiddetto processo di "**demielinizzazione**", tipico della sclerosi multipla. Alla base del fenomeno c'è un danno importante a carico degli **oligodendrociti**, cellule fondamentali nella produzione della **mielina**, sostanza che riveste come una guaina le fibre nervose e permette la conduzione del segnale nella comunicazione tra neuroni.

1.1 Ruolo del sistema immunitario a difesa dell'organismo

Quando un batterio o un virus invadono l'organismo, il sistema immunitario attiva le difese contro il corpo estraneo per rimuoverlo nel minor tempo possibile. Le sue funzioni non si limitano a questo, in quanto ha anche la capacità di rimuovere le cellule usurate, come eritrociti e detriti tissutali, per favorire la corretta guarigione delle ferite e il riparo dei tessuti. Inoltre, identifica e distrugge le cellule anormali o mutanti che si generano nell'organismo, attività che è il principale meccanismo di difesa interno contro lo sviluppo dei tumori.

Le principali cellule che compongono il sistema immunitario sono i leucociti (globuli bianchi) e i loro derivati, che, assieme alle proteine plasmatiche, svolgono azioni difensive e assicurano la corretta protezione. Derivano da cellule precursori nel midollo osseo o da colonie presenti nei tessuti linfoidei e circolano nel sangue, in modo da permettere il loro rapido trasporto al sito dove sono necessari.

Esistono 5 diversi tipi di leucociti che variano tra loro per struttura, funzione e numero:

- **Neutrofili:** sono specializzati nella fagocitosi, ma possono anche sottoporsi a morte cellulare programmata che permette loro di rilasciare nel liquido extracellulare sostanze battericide che distruggono i microrganismi
- **Eosinofili:** hanno la capacità di secernere sostanze che uccidono i parassiti
- **Basofili:** sintetizzano e accumulano l'istamina e l'eparina, importanti rispettivamente nelle reazioni allergiche e nella rimozione delle particelle lipidiche del sangue
- **Monociti:** diventano specializzati nella fagocitosi; vengono infatti rilasciati dal midollo osseo quando sono ancora immaturi e, nelle loro sedi, continuano a maturare e ingrandirsi fino a diventare i grandi fagociti tissutali noti come macrofagi
- **Linfociti:** ne esistono di due tipi, linfociti B e linfociti T. I primi producono anticorpi che circolano nel sangue e sono responsabili dell'immunità anticorpo-mediata; i secondi distruggono le cellule bersaglio rilasciando sostanze tramite l'attivazione dell'immunità cellulo-mediata

Linfociti T e B sono tra le cellule immunitarie coinvolte maggiormente nella patogenesi della sclerosi multipla

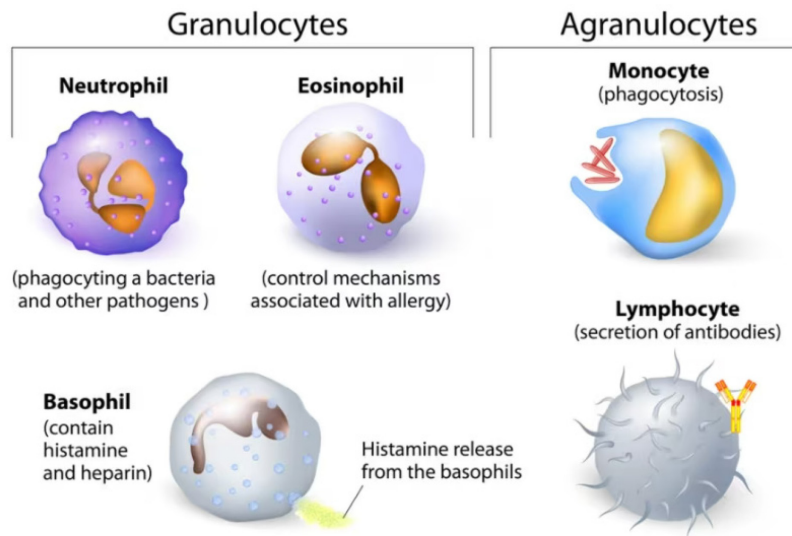


Figura 1: Classificazione dei leucociti

1.2 Sistema immunitario innato e sistema immunitario adattativo

Quando un agente estraneo invade l'organismo, la risposta difensiva che viene attivata può essere innata e aspecifica oppure adattativa e specifica; entrambe costituiscono il sistema immunitario che ha la funzione di proteggere il nostro corpo.

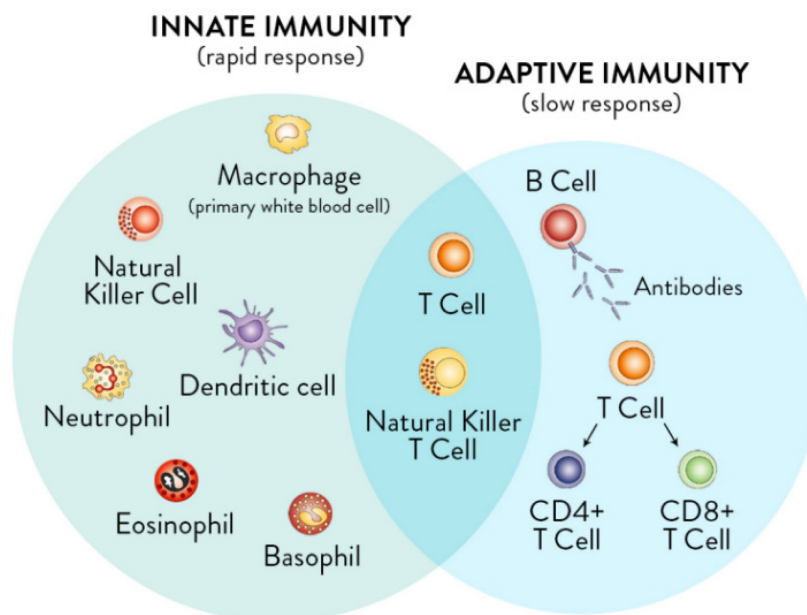


Figura 2: Cellule coinvolte nell'immunità innata e adattativa

Il **sistema immunitario innato** comprende quelle difese intrinseche dell'organismo, che lo proteggono selettivamente da qualsiasi materiale esterno anomalo, anche alla prima esposizione; gli elementi che ne fanno parte possono essere così suddivisi:

- **Inflammazone:** una serie di eventi innati, aspecifici, avviati in risposta ad una sostanza estranea, a un danno tissutale o ad entrambi. L'obiettivo dell'inflammazone è quello di far giungere alla zona invasa i fagociti e le proteine plasmatiche che sono in grado di isolare e distruggere gli invasori, di rimuovere i detriti, di preparare la successiva guarigione e riparazione
- **Interferone:** proteina secreta da una cellula quando viene invasa da un virus. Una volta rilasciato nel liquido extracellulare si lega alla membrana plasmatica delle cellule sane, alle quali segnala di prepararsi ad un possibile attacco virale. Questa molecola è in grado di indurre la produzione di enzimi capaci di rompere l'RNA messaggero virale e di inibire la sintesi proteica da parte delle cellule infettate. È un meccanismo di difesa a breve termine, poiché la sua attivazione può avvenire solo in un intervallo di tempo limitato; infatti, l'interferone fornisce una strategia di difesa che risponde rapidamente contro l'invasione virale finché non intervengono meccanismi immunitari più specifici ma più lenti nella risposta. L'interferone ha anche effetti anticancerosi, potenzia notevolmente le azioni delle cellule citolitiche che attaccano e distruggono sia le cellule infettate da virus sia le cellule cancerose. Inoltre, rallenta la divisione cellulare e sopprime la crescita tumorale
- **Cellule natural killer:** distruggono in modo aspecifico le cellule infettate da virus e le cellule cancerose, rilasciando sostanze che lisano le loro membrane e fornendo così una difesa immediata, nell'attesa che i linfociti T citotossici specifici diventino funzionali

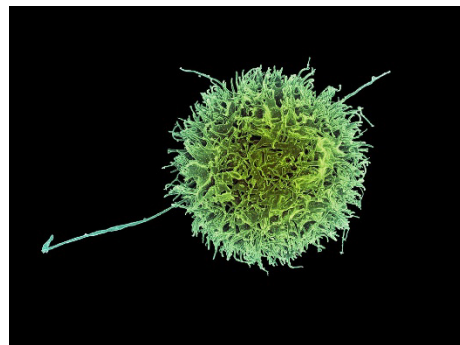


Figura 3: Immagine al microscopio di una cellula natural killer

- **Sistema del complemento:** meccanismo di difesa che viene attivato dall'esposizione ad anticorpi prodotti contro microrganismi invasori; questo sistema integra infatti l'azione degli anticorpi e distrugge le cellule bersaglio, tramite la formazione di complessi di attacco alla membrana, che formano dei pori attraverso i quali viene consentito un flusso

osmotico, che provoca il rigonfiamento e la lisi della cellula. L'innesco del sistema avviene tramite l'attivazione a cascata di diversi componenti che ne fanno parte: il primo, chiamato C1, attiva il C2, che a sua volta attiva il successivo e così via. I cinque componenti finali, da C5 a C9, si assemblano nel "complesso di attacco di membrana", responsabile della formazione dei pori.

Il **sistema immunitario adattativo**, invece, si basa su risposte immunitarie specifiche, dirette selettivamente contro una particolare sostanza estranea a cui l'organismo viene esposto. Nella sclerosi multipla è il tipo di risposta immunitaria che viene coinvolto maggiormente nel processo di patogenesi e sviluppo della malattia.

L'immunità adattativa può essere di due tipi: **immunità anticorpo-mediata** (o umorale) e **immunità cellulo-mediata**. La differenza fondamentale tra le due è rappresentata dal tipo di cellule che mediano la risposta a difesa dell'organismo: i **linfociti B** nel primo caso, i **linfociti T** nel secondo. Nella patogenesi della sclerosi multipla questi leucociti giocano un ruolo fondamentale, in quanto, attraverso svariati processi come la produzione di anticorpi, il rilascio di citochine e il reclutamento di altre cellule difensive, innescano il fenomeno infiammatorio che porta al danneggiamento della mielina che riveste gli assoni neuronali.

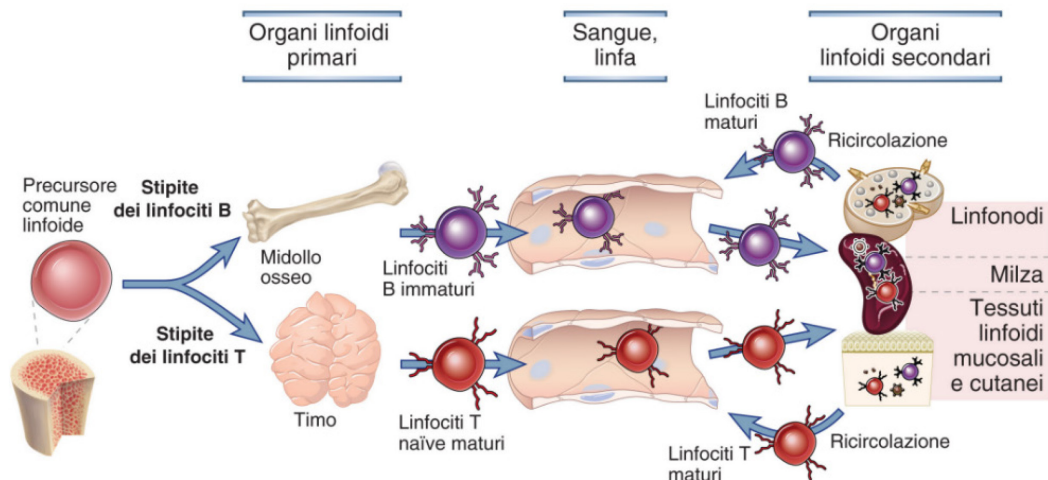


Figura 4: Origine e sviluppo dei linfociti

Tutti i linfociti hanno origine dal midollo osseo, all'interno del quale possono maturare per diventare di tipo B; alcuni di essi, attraverso il sangue, migrano dal midollo osseo al timo, nel quale subiscono un ulteriore processamento per diventare di tipo T.

Linfociti B e T maturi si localizzano nei tessuti linfoidi periferici, nei quali stabiliscono colonie e sono pronti ad entrare in azione, a seconda del tipo di immunità che viene chiamata in causa dall'organismo.

Diversamente dalle cellule dell'immunità innata, che presentano recettori toll-simili (TLR) che riconoscono marchi generici dei microrganismi invasori, i linfociti possiedono sulla loro superficie dei recettori (**BCR** nei linfociti B e **TCR** nei linfociti T) per il legame con un antigene specifico fra i molteplici possibili.

1.3 Linfociti B e immunità anticorpo-mediata

Quando un recettore **BCR** si lega con un antigene, la maggior parte dei linfociti B si differenzia in plasmacellule, specializzate nella produzione di anticorpi. I rimanenti linfociti diventano cellule della memoria dormienti, le quali non partecipano all'attacco immunitario contro il corpo estraneo, ma rimangono inattive fino ad una nuova esposizione allo stesso antigene, permettendo così un più rapido e facile intervento difensivo.

Gli **anticorpi** (o immunoglobuline) prodotti dalle plasmacellule sono molecole a forma di Y e vengono raggruppati in 5 sottoclassi, a seconda della loro attività biologica: **IgA**, **IgE**, **IgG**, **IgM**, **IgD**.

In entrambe le estremità dei bracci è presente un sito di legame per l'antigene chiamato **Fab**. Questi frammenti leganti l'antigene sono quindi variabili da anticorpo ad anticorpo, a seconda del tipo di molecola estranea con la quale sono in grado di legarsi ed interagire.

Nella struttura delle immunoglobuline è presente però anche una regione costante, la quale prende il nome di **Fc**; essa contiene i siti di legame per particolari mediatori di attività indotte dall'anticorpo, che variano tra le diverse sottoclassi.

Gli anticorpi non sono in grado di distruggere direttamente gli organismi estranei o i materiali indesiderati in seguito al legame degli antigeni alle loro superfici. Essi, invece, esercitano la loro azione difensiva bloccando fisicamente gli antigeni, o amplificando le risposte immunitarie innate. In particolare, possono agire a difesa dell'organismo mediante 4 meccanismi:

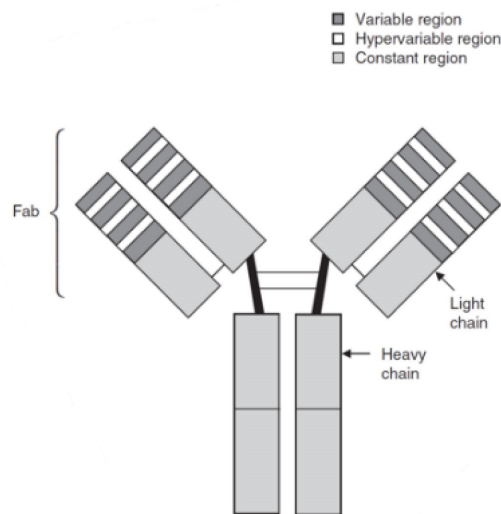


Figura 5: Struttura generale di un anticorpo

- Tramite un processo di **agglutinazione**: meccanismo di blocco fisico per il quale molteplici molecole anticorpali legano numerose molecole di antigene formando catene o reticoli di complessi antigene-anticorpo; se il complesso solubile è troppo grande per rimanere in soluzione tende a precipitare
- Attivando il **sistema del complemento**: quando un antigene appropriato si lega con un anticorpo, i recettori sulla coda di quest'ultimo si legano con C1, primo componente del sistema del complemento, attivandolo. Questo determina una cascata di eventi che induce la formazione del complesso di attacco alla membrana, portando alla generazione dei pori e alla successiva lisi della cellula
- Promuovendo la **fagocitosi**: gli anticorpi agiscono come opsonine, ovvero come molecole che, nel momento in cui rivestono un microrganismo, aumentano notevolmente l'efficienza della fagocitosi, in quanto sono riconosciute da recettori espressi sulla membrana dei fagociti. La zona della coda di un anticorpo va quindi a legarsi con un recettore sulla superficie di un fagocita, promuovendone la fagocitosi
- Stimolando le cellule **natural killer**: le NK presentano recettori per la regione costante della coda degli anticorpi. Quando la cellula bersaglio viene ricoperta da anticorpi, essi legano la cellula bersaglio alle natural killer, le quali lisano la membrana plasmatica distruggendo la cellula bersaglio

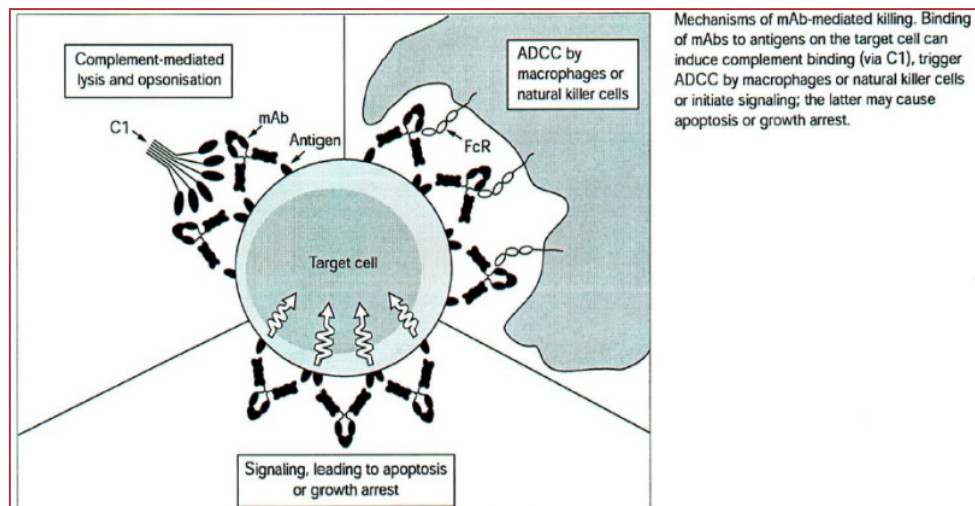


Figura 6: Meccanismi d'azione degli anticorpi

1.4 Linfociti T e immunità cellulo-mediata

I linfociti T difendono l'organismo contro gli invasori che si nascondono all'interno di cellule che gli anticorpi e il sistema del complemento non sono in grado di raggiungere. Questi difensori dell'organismo devono entrare direttamente in contatto con il loro bersaglio tramite un processo chiamato immunità cellulo-mediata. Come i linfociti B, anche i linfociti T sono altamente antigene-specifici, e presentano un proprio recettore sulla membrana plasmatica (TCR). Per favorire la loro completa attivazione, l'antigene estraneo, che attiva la risposta immunitaria, deve trovarsi sulla superficie di una cellula che presenta anch'essa un marcatore, chiamato autoantigene (o antigene "self"). Quindi, per far sì che un linfocita T si leghi ad una cellula bersaglio, sia gli antigeni estranei che gli autoantigeni devono trovarsi sulla superficie della stessa. L'esposizione all'antigene appropriato è generalmente seguita da un ritardo di pochi giorni prima che i linfociti T attivati siano in grado di lanciare l'attacco immunitario cellulo-mediato.

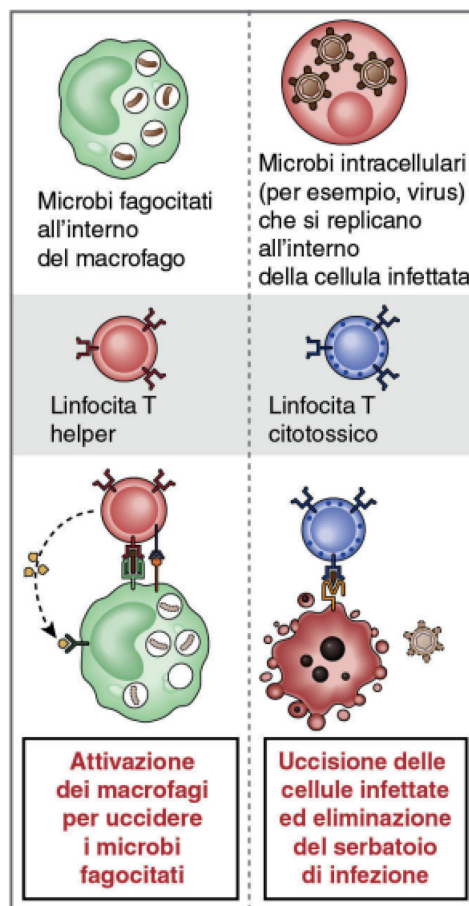


Figura 7: Ruolo dei linfociti T helper e citotossici

Esistono tre principali tipi di linfociti T:

- Linfociti T **“citotossici”** (CD8): distruggono le cellule ospiti che recano un antigene estraneo, come le cellule del corpo invase da virus o le cellule cancerose che contengono proteine mutate.

Quando un virus invade una cellula dell'organismo, questa degrada l'involucro proteico del virus e carica un frammento antigenico virale su un autoantigene neosintetizzato. Il complesso autoantigene-antigene virale viene inserito nella membrana superficiale della cellula ospite, con funzione di “bandiera” che segnala l'invasione del virus nella cellula. Per attaccare il virus intracellulare, i linfociti T citotossici devono distruggere la cellula ospite infettata nel processo: riconoscono e legano il complesso autoantigene-antigene e rilasciano sostanze chimiche letali.

Possono distruggere la cellula bersaglio rilasciando molecole di perforina, le quali penetrano nella membrana superficiale della cellula e si uniscono per formare dei pori; ciò permette il libero transito di sali e acqua, che provocano il rigonfiamento e la lisi della cellula bersaglio.

I linfociti T citotossici possono eliminare anche indirettamente la cellula ospite: rilasciano granzimi, proteine simili agli enzimi digestivi. Questi entrano nella cellula bersaglio attraverso i pori generati dalle molecole di perforina; una volta all'interno, inducono l'autodistruzione tramite apoptosi della cellula infettata dal virus.

- Linfociti T **“helper”** (CD4): non partecipano direttamente alla distruzione immunitaria dei microrganismi invasori, ma secernono sostanze che amplificano l'attività delle altre cellule immunitarie. Le sostanze rilasciate sono le citochine, che promuovono ed esaltano quasi tutti gli aspetti della risposta immunitaria. Tra le citochine più note secrete ci sono:
 - Il fattore di crescita dei linfociti B, che contribuisce alla funzione dei linfociti B insieme all'interleuchina 1 (IL-1) secreta dai macrofagi
 - Il fattore di crescita dei linfociti T, che aumenta l'attività dei linfociti T citotossici
 - Il fattore di inibizione della migrazione macrofagica, che potenzia l'attività distruttiva dei macrofagi. Agisce inibendo la migrazione delle cellule fagocitarie verso l'esterno, mantenendole nella zona interessata

Nella fisiopatologia della sclerosi multipla vengono coinvolti diversi tipi di cellule immunitarie; i linfociti T helper svolgono quindi un ruolo importante nell'attivare la risposta e coinvolgere altre cellule difensive. Hanno la capacità di differenziarsi in 3 tipi di linfociti T helper: “Th1”, “Th2” e “Th17”. In particolare, “Th1” e “Th17” sono considerati attori principali nei processi infiammatori della SM.³

“**Th1**” rilasciano citochine pro-infiammatorie come l’interferone- γ (IFN- γ) e il fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α) in grado di attivare i macrofagi e propagare l’infiammazione; “**Th2**”, al contrario, producono citochine anti-infiammatorie come le interleuchine 4 e 13 (IL-4, IL-13); “**Th17**” promuovono anch’essi l’infiammazione rilasciando svariate interleuchine (IL-17, IL-21, IL-22, IL-26)¹

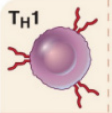

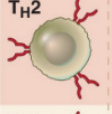

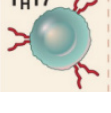
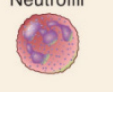
Linfociti T effettori	Citochine caratteristiche	Principali cellule bersaglio	Principali reazioni immunitarie
Th1 	IFN- γ	Macrofagi 	Attivazione dei macrofagi
Th2 	IL-4 IL-5 IL-13	Eosinofili 	Attivazione degli eosinofili e dei mastociti; attivazione alternativa dei macrofagi
Th17 	IL-17 IL-22	Neutrofili 	Reclutamento e attivazione dei neutrofili

Figura 8: Caratteristiche dei tre tipi di linfociti T helper esistenti

- Linfociti T “**regolatori**”: chiamati anche soppressori, sono un particolare tipo di linfociti T che svolge la funzione di attenuare la reazione infiammatoria causata dalle cellule immunitarie; il loro operato è riscontrabile nella fisiopatologia della sclerosi multipla, soprattutto nelle prime fasi dello sviluppo della malattia, in quanto si verificano episodi che prendono il nome di “ricadute”. Quest’ultime consistono nella “comparsa di nuovi sintomi o il peggioramento di sintomi già presenti per una durata di 24 ore, in assenza di febbre e infezioni”². Ciò spiega come i linfociti T regolatori abbiano la capacità di sopprimere il processo di demielinizzazione tipico della patologia, il quale però non verrà eliminato totalmente, ma si verificherà nel tempo sotto forma di altro attacco sintomatico.

1.5 Presentazione dell’antigene ai linfociti T

Come già accennato in precedenza, prima di poter essere riconosciuti dai linfociti T, gli antigeni estranei devono essere rielaborati da cellule specializzate, che li rendono così “presentabili” alle cellule difensive. Queste cellule che presentano l’antigene (**APC**) svolgono il ruolo di inglobare, modificare ed esporre sulla propria superficie gli antigeni associati a molecole di autoantigene, favorendo l’interazione con i linfociti T. Le cellule presentanti l’antigene comprendono i macrofagi, le cellule dendritiche e anche i linfociti B.

Gli autoantigeni, o antigeni self, sono glicoproteine legate alla membrana che vengono sintetizzate da un gruppo di geni chiamati complessi di maggior istocompatibilità (o MHC); l’attivazione dei linfociti T si verifica quando interagiscono con una data combinazione di molecola MHC-antigene estraneo. Ogni individuo possiede due classi principali di autoantigeni MHC:

- Molecole **MHC di classe I**: vengono riconosciute solo dai linfociti T citotossici
- Molecole **MHC di classe II**: vengono riconosciute solo dai linfociti T helper

I linfociti T citotossici possono rispondere agli antigeni estranei solo in associazione con le glicoproteine MHC di classe I, che si trovano sulla superficie di tutte le cellule nucleate dell'organismo. La specificità di legame si ottiene perché i corecettori "CD8" presenti sui linfociti citotossici sono in grado di interagire solo con il tipo I di autoantigeni MHC. Quando avviene il legame tra le cellule, i linfociti attivi sono liberi di attaccare e distruggere la cellula dell'organismo infettata da un antigene estraneo.

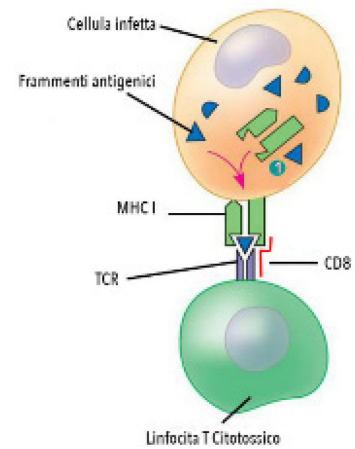


Figura 9: Interazione linfocita T citotossico-cellula infetta

Al contrario, i linfociti T helper interagiscono solo con le glicoproteine MHC di classe II, che si trovano sulla superficie delle cellule immunitarie in grado di presentare l'antigene: cellule dendritiche, macrofagi e linfociti B. Anche in questo caso il legame specifico è reso possibile dall'interazione con il corecettore "CD4" dei linfociti T helper, che è in grado di relazionarsi con molecole MHC di classe II.

L'attivazione dei linfociti B e dell'immunità anticorpo-mediata passa dall'interazione con i linfociti T helper, che devono legarsi alle glicoproteine di classe II presenti sui linfociti B, avendo questi anche la funzione di cellule APC. Il legame tra linfocita B recante l'antigene e il corrispondente linfocita T helper induce la cellula T a secernere le citochine, che attivano i cloni di linfociti B, portando così all'espansione e alla trasformazione di quest'ultimi in cellule della memoria o plasmacellule, le quali producono gli anticorpi.

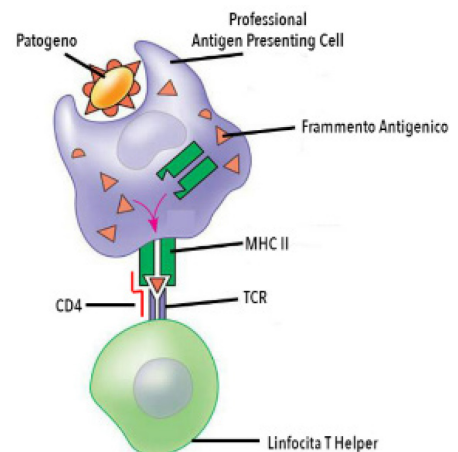


Figura 10: Interazione linfocita T helper-cellula APC

2. SISTEMA NERVOSO CENTRALE E SCLEROSI MULTIPLA

La specie umana è in grado di rispondere e reagire a determinati stimoli grazie ad una complessa ed organizzata elaborazione nervosa. Molti circuiti neuronali fondamentali per la vita, come quelli che controllano la respirazione e la circolazione, sono simili in tutti gli individui; tuttavia, lo sviluppo di determinate sinapsi rispetto ad altre è influenzato da possibili differenze genetiche e fattori ambientali, che possono causare una diversità interindividuale.

Il sistema nervoso è organizzato in **sistema nervoso centrale (SNC)**, che comprende encefalo e midollo spinale, e **sistema nervoso periferico (SNP)**, costituito dalle fibre che trasportano le informazioni dal SNC alle diverse zone dell'organismo.

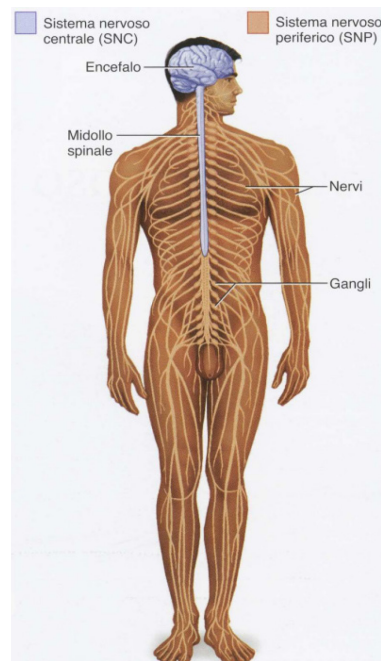


Figura 11: Suddivisione del sistema nervoso in centrale e periferico

All'interno del SNC i neuroni formano complesse reti di comunicazione che permettono di: regolare in modo inconscio l'ambiente interno per mezzo di segnali nervosi, provare emozioni, controllare in modo volontario il movimento, percepire il proprio corpo e l'ambiente circostante, sviluppare la coscienza e la capacità di giudizio. Ecco quindi che la propagazione rapida e indisturbata del segnale nervoso tra i neuroni è fondamentale per un corretto funzionamento del sistema nervoso.

All'interno del sistema nervoso centrale si possono trovare due tipi di cellule: i **neuroni**, specializzati nella generazione e conduzione di impulsi nervosi, e le **cellule gliali**, che intervengono nei processi infiammatori e attivano la risposta immunitaria.

2.1 Neuroni

Il neurone è una cellula specializzata che ha il compito fondamentale di generare e condurre un segnale elettrico lungo la propria membrana, per poi trasmetterlo ad altri neuroni o cellule effettrici. La struttura della cellula nervosa deve quindi essere in grado di permettere la trasmissione del segnale, per questo motivo è costituita da un corpo cellulare che contiene il nucleo, ma anche da una serie di prolungamenti, tra i quali il principale è chiamato **assone**, il quale serve proprio a trasmettere a distanza il segnale nervoso. La conformazione dell'assone termina con ramificazioni dette terminali assonici, le quali hanno una lunghezza variabile a seconda del tipo di neurone. ⁴ Gli altri prolungamenti sono più brevi, molto ramificati e ricchi di

connessioni con altri neuroni, e vengono detti dendriti; la loro funzione principale consiste nel ricevere il messaggio nervoso da altri neuroni. I neuroni sono localizzati a livello della sostanza grigia nel sistema nervoso centrale, oppure nei gangli del sistema nervoso periferico.

La membrana che ricopre l'assone (assolemma), a differenza della semplice membrana plasmatica che protegge il corpo cellulare, è rivestita da uno strato di **mielina**, sostanza che va a formare la guaina mielinica, prodotta dagli **oligodendrociti** nel sistema nervoso centrale o dalle cellule di Schwann nel sistema nervoso periferico. Sono proprio gli oligodendrociti che nella sclerosi multipla vengono attaccati dal sistema immunitario, a seguito del riconoscimento come antigene estraneo della **proteina basica della mielina**, che avviene da parte delle cellule deputate alla difesa.

Lungo il decorso dell'assone si osservano punti di interruzione della guaina mielinica, detti nodi di Ranvier, che corrispondono alla zona dove una cellula di Schwann o un oligodendrocita subentra al precedente. Questa interruzione fa in modo che l'impulso elettrico possa "saltare" da un nodo all'altro, con una velocità di conduzione del segnale molto più elevata rispetto a quella delle fibre amieliniche. ⁴

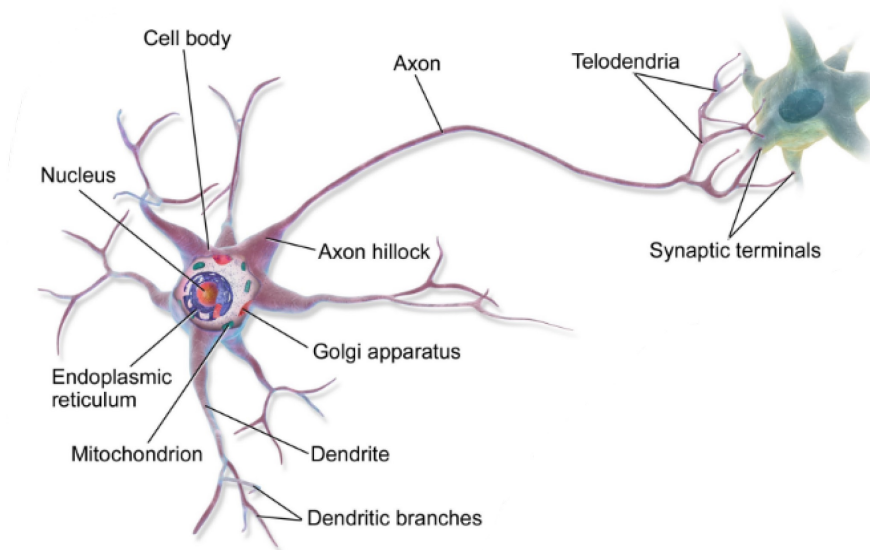


Figura 12: Struttura di un neurone

2.2 Comunicazione tra neuroni

La comunicazione tra neuroni avviene a livello delle **sinapsi**, zone in cui il segnale elettrico viene trasmesso dal neurone presinaptico a quello postsinaptico.

Dal punto di vista funzionale le sinapsi possono essere grossolanamente distinte in eccitatorie, capaci cioè di depolarizzare il potenziale di membrana, e inibitorie, che, al contrario, determinano una riduzione del potenziale di membrana del neurone postsinaptico.

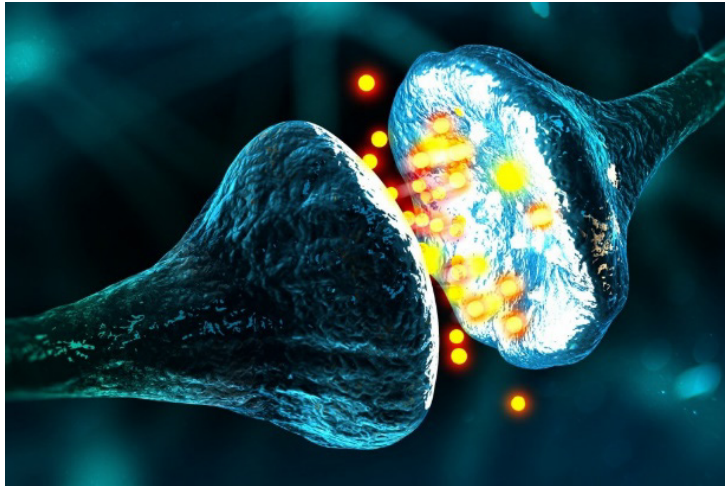


Figura 13: Sinapsi chimica tra due neuroni con rilascio di neurotrasmettitore (sfere arancioni)

Il segnale può propagarsi come tale attraverso giunzioni comunicanti nel caso di sinapsi elettriche, oppure viene tradotto nella liberazione di una sostanza chimica nel caso di sinapsi chimiche. Quest'ultime, attraverso il legame della sostanza liberata con specifici recettori postsinaptici, provocano un effetto eccitatorio o inibitorio. Le sostanze che vengono rilasciate sono i neurotrasmettitori, che vengono sintetizzati ed accumulati all'interno di vescicole sinaptiche. All'arrivo dell'impulso nervoso, le vescicole liberano nella fessura sinaptica il neurotrasmettitore che, legandosi ai recettori posizionati sulla membrana postsinaptica, causa la risposta della cellula. ⁴

Per poter modulare la risposta recettoriale, l'organismo dispone di sistemi specifici che operano per ridurre la concentrazione dei neurotrasmettitori a livello sinaptico. Questa azione può essere svolta da trasportatori che recuperano la sostanza chimica e la riportano all'interno delle vescicole presinaptiche, oppure da enzimi, come l'acetilcolinesterasi per l'acetilcolina, che idrolizza quest'ultima scindendola in colina ed acido acetico.

2.3 Cellule gliali

Oltre che dai neuroni che comunicano tra loro, il corretto funzionamento del sistema nervoso centrale è garantito anche dalle cellule gliali e dai vasi sanguigni. I fenomeni che scatenano l'insorgere della sclerosi multipla come patologia autoimmune vedono coinvolte anche questo tipo di unità biologiche. In particolare, un ruolo importante nella patogenesi è svolto dalle cellule della **microglia**; astrociti e oligodendrociti fanno invece parte delle cellule della macroglia. Nel sistema nervoso periferico si trova invece un solo tipo di glia, rappresentato dalle cellule di Schwann.

Gli **astrociti** hanno forma stellata e ricoprono un ruolo di sostegno ai neuroni e intervengono anche nei processi riparativi; un'altra funzione che esercitano è quella di supporto metabolico al neurone, mantenendo l'omeostasi idroelettrolitica all'interno del sistema nervoso centrale. Possono comunicare tra loro attraverso canali ionici localizzati tra i loro prolungamenti, che formano una rete responsabile della trasmissione di segnali per regolare la loro attività metabolica.

4

Tramite la produzione di fattori di crescita e l'azione di proteasi che distruggono i residui cellulari in seguito ad una lesione, queste cellule della macroglia sono in grado di svolgere un'azione protettiva nei confronti dei neuroni. È proprio questa capacità di modellare la formazione di tessuto cicatriziale che porta alla generazione delle cosiddette “**placche**” o “**sclerosi**”, tipiche della sclerosi multipla: gli astrociti operano provocando la formazione di cicatrici nelle zone in cui la mielina è stata danneggiata dalle cellule immunitarie.

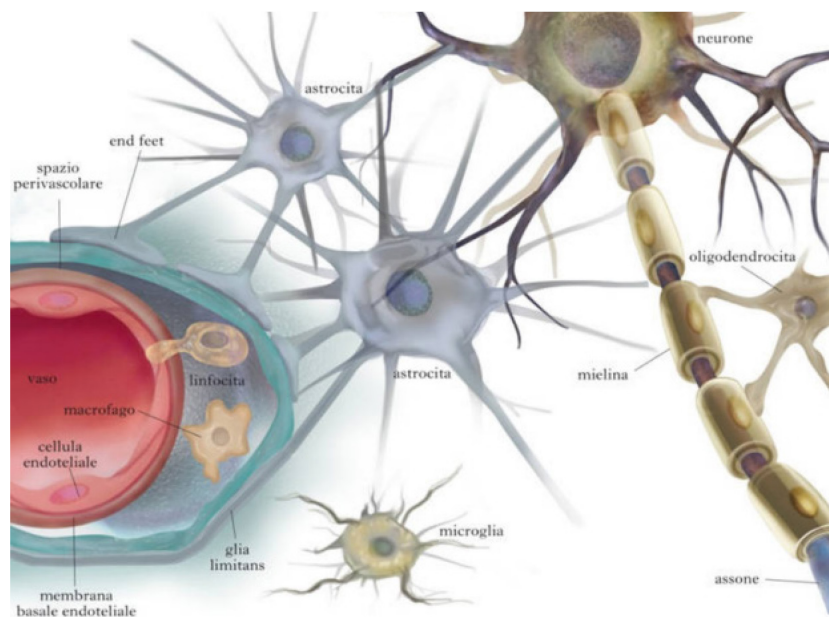


Figura 14: Astrociti (a forma stellata in blu) a contatto con un vaso sanguigno (a sx) e un neurone (a dx)

Ponendosi in contatto con la parete dei vasi cerebrali, gli astrociti sono responsabili dell'instaurarsi della **barriera ematoencefalica (BEE)**, che limita in maniera selettiva l'entrata di sostanze all'interno del sistema nervoso centrale. La permeabilità della barriera ematoencefalica dipende dalle giunzioni fra le cellule endoteliali dei capillari cerebrali e può essere modulata dagli astrociti tramite la produzione di citochine.

Attraverso questa barriera possono avvenire perciò scambi altamente regolati; di conseguenza, il trasporto attraverso le pareti capillari con passaggio tra le cellule che formano le pareti è anatomicamente impedito, mentre il trasporto attraverso di esse è fisiologicamente limitato. Limitando gli scambi, la BEE minimizza quindi la possibilità che sostanze potenzialmente dannose raggiungano il tessuto nervoso centrale, e protegge l'encefalo dalle fluttuazioni chimiche che possono avvenire nel sangue. L'attività della barriera ematoencefalica è la risultante della combinazione di tre funzioni: barriera fisica, per la presenza di giunzioni strette tra le cellule che riducono il flusso di sostanze che può entrare; barriera di trasporto, per l'attivazione di determinati meccanismi di spostamento che mediano il flusso di soluti; barriera metabolica, per l'azione di enzimi che metabolizzano le molecole in transito.⁵

Sebbene la BEE si presenti naturalmente come un alleato dell'organismo avente il delicato ruolo di proteggere l'encefalo da diversi tipi di molecole, allo stesso tempo è vista come un ostacolo per la progettazione di farmaci che sarebbe vantaggioso esercitassero il proprio effetto farmacologico all'interno del SNC. Studi di fase tre stanno valutando l'efficacia di alcuni farmaci potenzialmente impiegabili come trattamento nella sclerosi multipla. Queste molecole agiscono inibendo la **tirosina chinasi di Bruton (BTK)**, espressa in diverse tipologie di cellule; alcuni di essi hanno anche la capacità di attraversare la BEE e agire così a livello neuronale per ostacolare direttamente il processo di demielinizzazione.

2.4 Oligodendrociti

All'interno del sistema nervoso centrale, a livello degli assoni dei neuroni, il fondamentale compito di produrre la mielina è svolto dagli oligodendrociti, cellule ampiamente rappresentate e diffuse in tutto il SNC; presentano un corpo cellulare più contenuto rispetto agli astrociti e hanno pochi prolungamenti cellulari. Le cellule di Schwann esercitano la stessa funzione nel sistema nervoso periferico; tuttavia, vi sono notevoli differenze tra le due cellule: la mielina prodotta differisce per la sua struttura chimica e, inoltre, mentre una cellula di Schwann avvolge un solo assone, l'oligodendrocita può avvolgere più assoni, creando così l'unità oligodendrocitica (l'oligodendrocita più gli assoni che esso avvolge).⁴

Nelle malattie demielinizzanti come la sclerosi multipla, il fenomeno ossidativo gioca un ruolo non indifferente, in quanto contribuisce alla patogenesi e allo sviluppo del disturbo. Le cellule OPC, ovvero i precursori degli oligodendrociti, sono particolarmente vulnerabili allo stress ossidativo; ciò è dovuto ai bassi livelli di enzimi antiossidanti e proteine anti-apoptotiche che li caratterizzano.³

La principale causa dei fenomeni ossidativi che si verificano è la liberazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte di cellule della microglia e macrofagi attivati. È infatti stato osservato come, nelle lesioni della sclerosi multipla, le cellule della microglia vadano a causare stress ossidativo mediante la produzione di radicali, indicando così la loro importanza nei processi di demielinizzazione e neurodegenerazione tipici della patologia.³

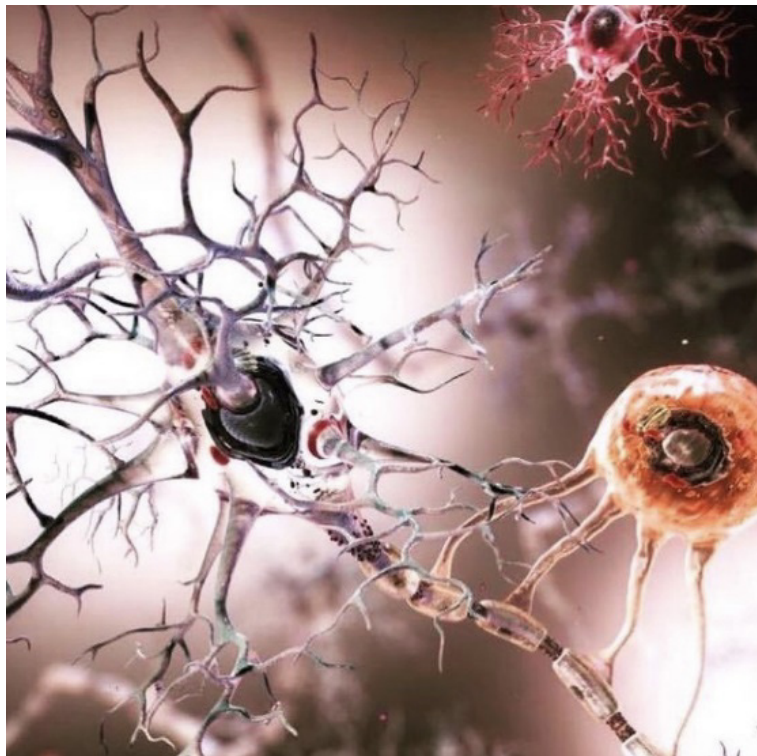


Figura 15: Oligodendrocita (in basso a dx) che ripara la mielina danneggiata di un assone; in alto a dx è raffigurata una cellula della microglia

2.5 Cellule della microglia

Le cellule della microglia presentano un nucleo piccolo, con poco citoplasma e scarsi prolungamenti di breve lunghezza. A differenza di tutte le cellule della macroglia e dei neuroni, esse originano da cellule ad attività fagocitaria: i macrofagi. Quando giungono nel sistema nervoso centrale, le cellule della microglia perdono la loro capacità di movimento, trasformandosi da cellule di tipo ameboide in cellule dendritiche. Per questo sono anche conosciute come **macrofagi residenti del sistema nervoso centrale**. In condizioni di danno neuronale, tornano ad assumere un aspetto ameboide e migrano nell'area colpita, dove svolgono un ruolo macrofagico e rilasciano mediatori del processo infiammatorio. Quando si verifica un'infezione vengono quindi reclutate e coinvolte nei processi di fagocitosi, presentazione dell'antigene e produzione di citochine. ⁴

Nella sclerosi multipla possono funzionare da cellule presentanti l'antigene (APCs) e giocano un ruolo importante nei processi di demielinizzazione e rimielinizzazione. Nei pazienti con la patologia, infatti, la distruzione della mielina nel sistema nervoso centrale è associata all'azione di elementi del sistema immunitario, in particolare macrofagi e cellule della microglia. Quest'ultime esprimono gli autoantigeni dei complessi maggiori di istocompatibilità di entrambe le classi, inoltre hanno la capacità di rilasciare citochine pro o antiinfiammatorie, a seconda del fenotipo che prende parte alla reazione immunitaria. È possibile, infatti, distinguere due sottotipi di cellule della microglia: il primo, **M1**, comprende le unità biologiche che promuovono l'infiammazione e il danno agli oligodendrociti, portando alla produzione di citochine proinfiammatorie come l'interleuchina-1 β (IL-1 β) e il fattore di necrosi tumorale (TNF- α). Il fenotipo **M2**, al contrario, secerne citochine antiinfiammatorie come l'interleuchina 10 (IL-10) e la citochina CCL22. ³

Alcuni studi effettuati su topi hanno riscontrato come le cellule della microglia svolgano un importante ruolo anche nella rimielinizzazione, il processo conseguente alla demielinizzazione durante il quale si verifica la ricostruzione della mielina attorno all'assone. In particolare, è stato visto come la produzione di sostanze come TNF- α , l'insulin-like growth factor (IGF-1) e il fibroblast growth factor (FGF-2) favorisca la proliferazione degli oligodendrociti.³ Purtroppo però, nei pazienti con sclerosi multipla, la rimielinizzazione non avviene in maniera totalmente adeguata; ciò è dovuto ad un blocco della differenziazione delle cellule OPC, i precursori degli oligodendrociti, che comporta un incremento progressivo ed inarrestabile della disabilità. ³

Durante il processo di demielinizzazione e danno a livello degli oligodendrociti, la microglia influenza il reclutamento di cellule del sistema immunitario adattativo all'interno del sistema nervoso centrale. Nello specifico, le cellule della microglia agiscono tramite l'espressione dei complessi maggiori di istocompatibilità I e II, potendo così fungere da APCs per i linfociti T. La

microglia può quindi interagire con i linfociti T al fine di stimolare o inibire la loro funzione. Nel primo caso, attraverso le sue molecole stimolatrici, interagisce coi recettori CD28 delle cellule T, delle quali provoca la proliferazione e la funzione secretoria di citochine. Nel secondo caso regola negativamente le funzioni vitali dei linfociti T legandosi al recettore CTLA4 e causando l'apoptosi cellulare.³

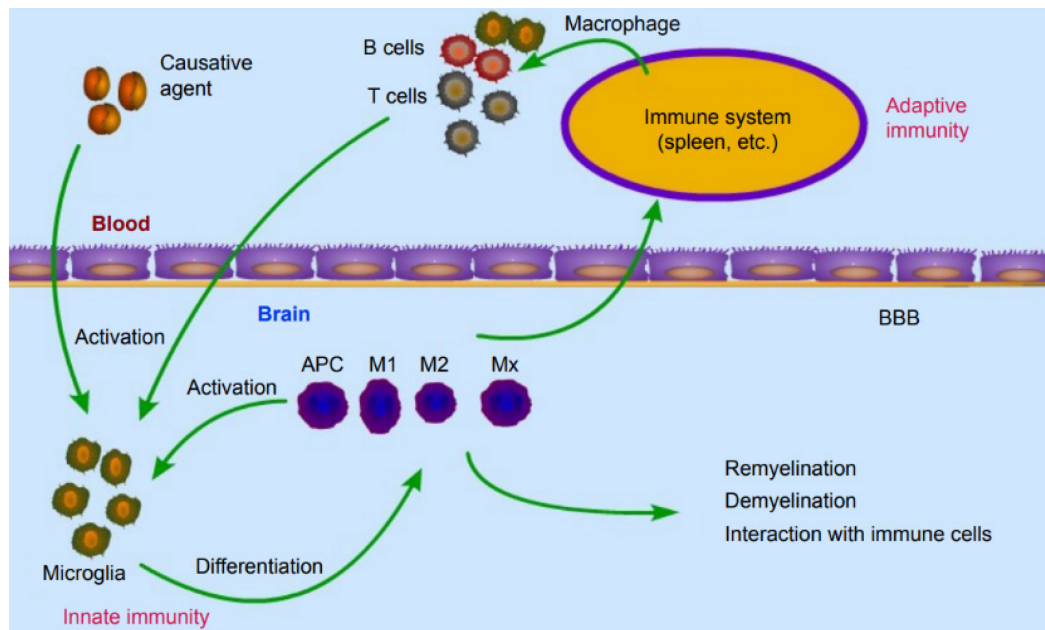


Figura 16: Ruolo della microglia nei processi di infiammazione della SM

3. FISIOPATOLOGIA DELLA SCLEROSI MULTIPLA

Come già illustrato nel precedente capitolo, il cervello, e i neuroni al suo interno, sono separati dall'esterno per mezzo della barriera ematoencefalica, che protegge il sistema nervoso centrale da avvelenamenti ed intossicazioni, regolando selettivamente il passaggio di sostanze. Solo un certo tipo di molecole sono in grado di oltrepassarla: per cellule immunitarie come i linfociti T e i linfociti B questo significa disporre di un corretto ligando o una molecola di superficie che interagisca al meglio con la barriera e permetta il passaggio attraverso di essa. Nella patogenesi della sclerosi multipla, proprio il passaggio attraverso la BEE di cellule immunitarie è l'evento che provoca l'infiammazione a livello degli oligodendrociti, scatenando i processi di demielinizzazione che portano all'esordio della malattia.

Può verificarsi l'esposizione di un antigene estraneo ad una cellula in grado di presentarlo, come ad esempio un macrofago: quest'ultimo fagociterà l'antigene con il quale è entrato in contatto e, tramite il complesso maggiore di istocompatibilità, lo esporrà sulla sua superficie. Una volta esposto, l'antigene potrà essere presentato ad un altro tipo di cellula, come un linfocita T helper. L'interazione tra le due cellule porterà ad avere il linfocita in grado di riconoscere quel particolare tipo di antigene ogni volta che si verificherà un'ulteriore esposizione.

Nel caso della sclerosi multipla l'evento scatenante che si verifica aiuta a chiarire il significato di "patologie autoimmuni": i linfociti T, che avevano interagito con le cellule presentanti l'antigene, invece di identificare la molecola estranea, riconoscono la proteina basica della mielina, poiché essa presenta delle similitudini con l'antigene estraneo a livello di struttura molecolare. Nel momento in cui i linfociti entreranno nel sistema nervoso centrale attraversando la barriera ematoencefalica, riconosceranno la mielina presente sulla superficie degli oligodendrociti. Ecco che verrà attivata la risposta immunitaria: i linfociti T inizieranno a rilasciare citochine come IL-6, IL-1, il TNF- α e IFN- γ , tutte molecole che favoriscono l'infiammazione e regolano l'attivazione della risposta immunitaria, inducendo una reazione pro-infiammatoria.

Queste sostanze, prodotte dalle cellule che riconoscono la mielina come agente estraneo, sono responsabili di diverse azioni:

- A livello delle cellule endoteliali della barriera ematoencefalica, aumentano l'espressione di alcuni tipi di **marcatori di adesione**, in modo che, una volta che i globuli bianchi passano tramite la circolazione sanguigna, possano aderire e raggiungere l'area interessata
- Stimolano la **vasodilatazione**, favorendo quindi un maggior afflusso di sangue e di conseguenza un maggior numero di cellule immunitarie che possono venire reclutate

- Incrementano la **permeabilità capillare**, in modo che più globuli bianchi possano dirigersi dai vasi all'area dove si è presentato il problema
- Favoriscono la **chemiotassi** entrando direttamente nel flusso sanguigno; verranno quindi stimolati altri tipi di linfociti a svolgere la loro funzione difensiva
- Attirano verso la zona interessata i **macrofagi**; questo ruolo è svolto perlopiù dall'IFN- γ , il quale, migrando nel circolo sanguigno, attiva e recluta le cellule fagocitarie responsabili del danno diretto agli oligodendrociti; a rendere la risposta ancora più efficiente sono i linfociti B, che si muovono verso la zona interessata e procedono nella specializzazione in plasmacellule, le quali hanno la funzione di produrre gli anticorpi specifici per la proteina della mielina. Marcando gli oligodendrociti tramite gli anticorpi, viene quindi favorita maggiormente l'azione dei macrofagi.

Ciò che risulta da questa vasta e completa risposta immunitaria è un danno non indifferente a livello degli oligodendrociti; l'azione delle cellule fagocitarie porta ad una perdita progressiva di mielina a livello degli assoni, tramite quel processo che prende il nome di demielinizzazione. Successivamente, l'azione degli astrociti e altre cellule che favoriscono il processo riparativo, porta alla formazione di tessuto cicatriziale nell'area del neurone danneggiata, dando vita così alle cosiddette placche o sclerosi. Questo fenomeno coinvolge diversi neuroni che vengono tutti danneggiati tramite lo stesso meccanismo, portando in questo modo alla patogenesi della sclerosi multipla, alla quale segue il manifestarsi dei primi sintomi della malattia.

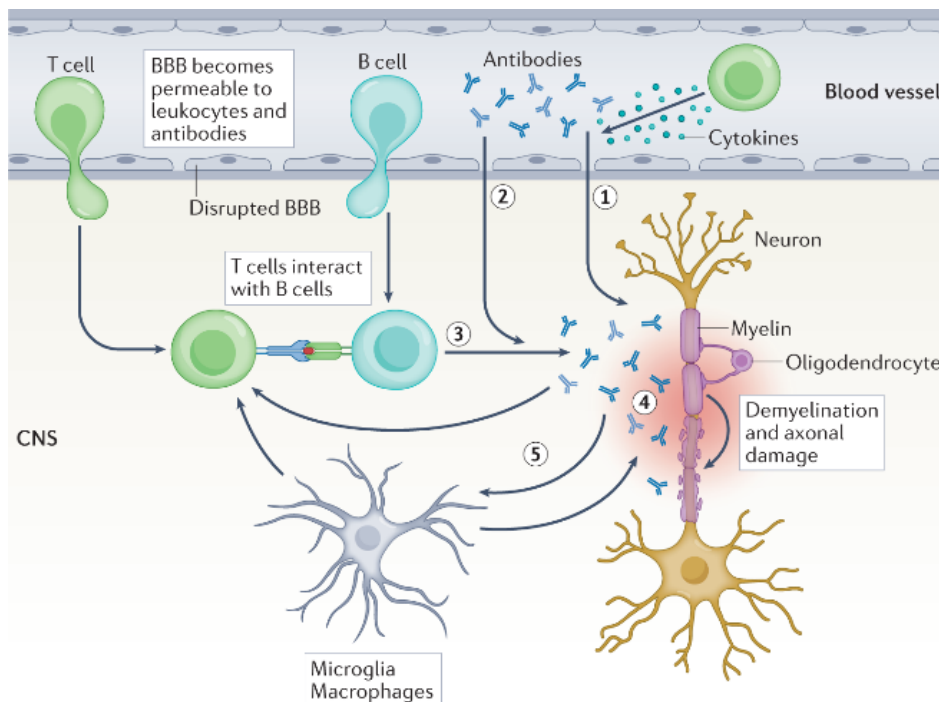


Figura 17: Processi infiammatori della SM che portano a demielinizzazione

3.1 Cause

La sclerosi multipla è un disturbo demielinizzante che si ritiene abbia un'etiologia autoimmune con stimolo antigenico incerto. Infatti, le cause che portano allo sviluppo della malattia non sono del tutto chiare, ma sembra esserci una correlazione con fattori ambientali come il **virus di Epstein-Barr (EBV)** o il **virus dell'herpes umano di tipo 6 (HHV-6)**, livelli bassi di **vitamina D** e fattori genetici, come la presenza **del cromosoma XX**, che giustifica un'incidenza della patologia superiore nelle donne rispetto agli uomini (rapporto di 3:1). Anche altri fattori di rischio, come ad esempio il fumo, potrebbero contribuire allo sviluppo della patologia. Nella maggior parte dei casi ciò che determina l'origine della sclerosi multipla non è mai un solo fattore di rischio: essendo una patologia multifattoriale, è proprio la combinazione di più cause tra loro che provoca la reazione inadeguata del sistema immunitario, portando successivamente al danno neuronale e alla comparsa dei primi sintomi. ¹

Diversi studi condotti sia nei bambini che negli adulti hanno dimostrato un'associazione inversa tra valori di vitamina D e rischio di sclerosi multipla. ⁶ Nel mondo, infatti, si registra un'incidenza maggiore della patologia nelle popolazioni che vivono al polo nord e al polo sud, aree in cui c'è chiaramente un'esposizione alla luce solare minore rispetto alle altre zone del mondo. In particolare, è stato dimostrato come bassi livelli di vitamina D vadano ad influenzare l'espressione di **HLA-DRB*51**, un allele del gene che codifica per il MHC di classe II. Questa alterazione determina una ridotta capacità di riconoscere autoantigeni, provocando la produzione di linfociti T autoreattivi che contribuiscono al processo infiammatorio della sclerosi multipla. ¹

Anche le concentrazioni di alcuni minerali nell'organismo possono concorrere alla patogenesi della sclerosi multipla. Nello specifico, livelli diversi da quelli fisiologici di Zinco, Rame, Manganese e Ferro, contribuiscono alla generazione di processi infiammatori stimolando la produzione di citochine, e favoriscono lo stress ossidativo. Lo **Zinco** funge da cofattore per molti enzimi responsabili del rimodellamento della matrice extracellulare; è inoltre un componente della proteina basica della mielina, oltre che un importante regolatore della trascrizione genica e antiossidante che previene l'infiammazione. Livelli troppo bassi di questo minerale possono quindi alterare le funzioni fisiologiche e concorrere allo sviluppo di processi infiammatori. Al contrario, per **Ferro, Rame e Manganese**, valori troppo elevati nell'organismo promuovono lo stress ossidativo e attivano le cellule del sistema immunitario. Il Ferro contribuisce alla formazione di specie reattive dell'Ossigeno (ROS), attiva le cellule della microglia e può anche danneggiare la BEE. Analogamente, il Manganese favorisce gli stessi processi, promuovendo il rilascio di citochine pro-infiammatorie come IL-6 e l'attivazione del fattore di trascrizione **NF-kB**, che svolge un ruolo primario nella regolazione della risposta immunitaria, nell'infiammazione e nella proliferazione cellulare. ¹

3.2 Forme

Le forme attraverso cui la patologia può manifestarsi dipendono dal decorso clinico dei sintomi registrati nel tempo. Esistono diverse varianti di sclerosi multipla, ma quelle più diffuse e conosciute sono 4: **CIS** (Clinically Isolated Syndrome), **RRMS** (Relapsing-remitting MS), **SPMS** (Secondary progressive MS), **PPMS** (Primary progressive MS).

Clinically isolated syndrome (CIS)

Per diagnosticare la sindrome clinicamente isolata, deve verificarsi un episodio neurologico della durata di almeno 24 ore, ovviamente causato da un processo di demielinizzazione all'interno del sistema nervoso centrale. I sintomi possono essere diversi in relazione alla sede delle lesioni nel SNC. Le persone nelle quali viene rilevata la CIS non sviluppano necessariamente la sclerosi multipla, in quanto è necessario che nel tempo si verifichino altri attacchi sintomatici e nuove lesioni in altre zone del sistema nervoso centrale.⁷

Relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS)

Nella maggior parte dei casi è la sclerosi multipla recidivante-remittente la forma che si manifesta inizialmente nei soggetti; infatti, l'**85%** delle persone diagnosticate sviluppa questo tipo di patologia. È caratterizzata dalle cosiddette “**ricadute**”, episodi acuti della malattia che successivamente regrediscono fino a scomparire, per far posto a periodi di benessere completo (che prendono il nome di “**remissioni**”). Una ricaduta viene definita come la “comparsa di nuovi sintomi o il peggioramento di sintomi già presenti per una durata di 24 ore, in assenza di febbre e infezioni”

Nella forma recidivante-remittente si alternano quindi episodi acuti sintomatici e remissioni; quello che si verifica nella maggior parte dei casi, però, è un progressivo aumento del deficit neurologico ogni volta che termina un attacco acuto. In questo modo si raggiungerà nel tempo uno stato patologico che vedrà via via peggiorare le funzioni cognitive e motorie della persona affetta da sclerosi multipla. Tra un episodio acuto e l'altro potrebbe avviarsi il processo di rimielinizzazione, anche se il recupero della funzione neuronale non sarà mai totale.⁷

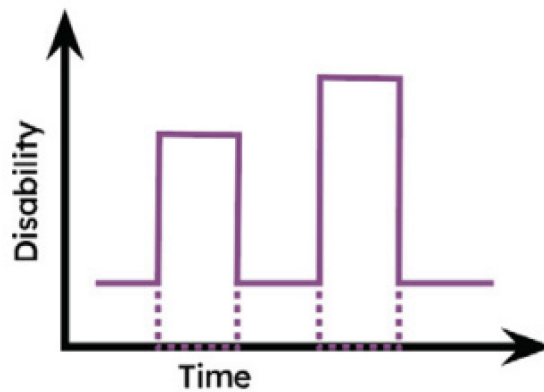


Figura 18: Grafico che mette in relazione l'andamento della disabilità in funzione del tempo nella RRMS

Secondary progressive multiple sclerosis (SPMS)

Solitamente, le persone diagnosticate con la sclerosi multipla recidivante-remittente non mantengono questa forma per tutta la vita. Ciò che avviene è un'evoluzione nella forma secondariamente progressiva, caratterizzata anch'essa da ricadute sintomatiche, che però nel tempo portano ad un costante e graduale aumento della disabilità. La forma secondaria può essere quindi considerata come l'evoluzione della recidivante-remittente, e come quest'ultima può essere distinta in attiva o non attiva; nel primo caso si verificano ricadute e c'è un'evidenza di attività di malattia alla risonanza, nel secondo le recidive non si manifestano ma la disabilità continua comunque a progredire nel tempo.

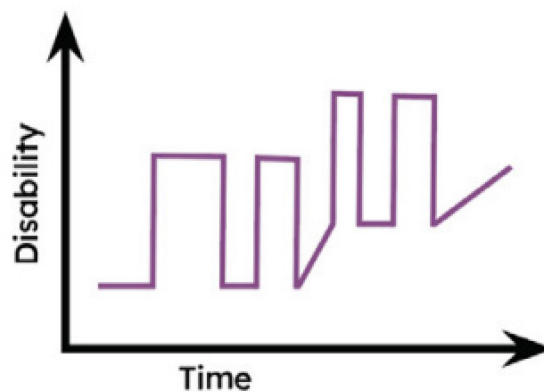


Figura 19: Grafico che mette in relazione l'andamento della disabilità in funzione del tempo nella SPMS

Primary progressive multiple sclerosis (PPMS)

La forma di sclerosi multipla primariamente progressiva è il tipo di patologia più disabilitante e severa, che, fortunatamente, colpisce una percentuale bassa di soggetti (~10%). Se con la forma recidivante-remittente si verificavano ricadute con demielinizzazione e c'era la possibilità di un recupero durante i periodi di remissione, in questo caso si registra un aumento costante della disabilità per tutto il tempo, senza possibilità di remissione. Questa forma è caratterizzata da un peggioramento delle funzioni neurologiche fin dalla comparsa dei primi sintomi, con un meccanismo alla base della malattia che si ritiene essere differente.

Anche la sclerosi multipla primariamente progressiva può manifestarsi come forma attiva (con ricadute però occasionali e/o evidenza di attività di malattia alla risonanza) o non attiva, così come progressiva o non progressiva.⁷

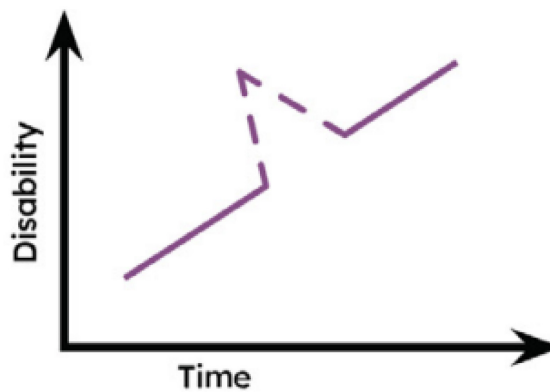


Figura 20: Grafico che mette in relazione l'andamento della disabilità in funzione del tempo nella PPMS

Se classificata in base alle componenti cellulari che si trovano in prevalenza nel quadro patologico, la SM presenta quattro sottotipi patologici: tipo 1, tipo 2, tipo 3 e tipo 4. Il **tipo 1** è caratterizzato da una predominante demielinizzazione cellulo-mediata, che mostra il ruolo dell'immunità cellulare, con una preponderanza di macrofagi. Il **tipo 2** presenta un danno sia cellulo-mediato che umorale, anticorpale e mediato dal complemento. Il **terzo tipo** è contraddistinto da distrofia degli oligodendrociti e apoptosi, che in ultima istanza colpisce la proteina mielinica. Il **quarto** e ultimo **tipo** mostra un danno agli oligodendrociti simile ad un'infezione virale o a un danno mediato da tossine, non correlato all'autoimmunità. Le varianti cliniche aiutano ad assegnare il trattamento appropriato, mentre i sottotipi patologici aiutano a identificare l'eziologia.¹

4. SINTOMATOLOGIA

Quando un soggetto viene colpito da sclerosi multipla, le lesioni che si sviluppano possono interessare svariate aree dell'encefalo e del midollo spinale. A seconda della localizzazione del danno a livello centrale, si possono manifestare svariati sintomi, dalla fatica o dolore, fino a disturbi visivi e della coordinazione. La sclerosi multipla è una patologia autoimmune multisintomatica, in quanto le lesioni del sistema nervoso centrale si traducono in un'alterazione di diverse funzionalità dell'organismo umano. I sintomi possono essere suddivisi in comuni e meno comuni, tenendo sempre conto del fatto che essi si presentano in modo differente da persona a persona, e che generalmente la loro frequenza aumenta con la gravità e la durata della malattia. Ci sono però alcuni sintomi iniziali che si verificano con più frequenza ed accomunano la maggior parte dei soggetti. La maggior parte dei sintomi della sclerosi multipla può essere trattata con successo tramite le terapie farmacologiche specifiche, ma giocano un ruolo fondamentale anche quelle che non ricorrono all'uso di farmaci, tra le quali è di enorme aiuto la riabilitazione.

4.1 Fatica

È uno dei sintomi più comuni della malattia, può essere definita come una percezione soggettiva di stanchezza, affanno e perdita di energia non correlabili al livello di esercizio svolto. Le persone si sentono infatti esauste anche in situazioni regolari di vita quotidiana, di riposo o che, in una condizione non patologica, non porterebbero a provare stanchezza.⁸ È possibile suddividere la fatica che compare nella sclerosi multipla in **primaria**, conseguenza diretta del danno prodotto dall'infiammazione nel sistema nervoso centrale, e **secondaria**, legata invece allo stato emotivo o ad altre condizioni debilitanti, come ad esempio i disturbi del sonno. In ogni persona si manifesta in maniera soggettiva, anche riguardo al periodo della giornata durante il quale essa compare: in qualcuno potrebbe svilupparsi maggiormente durante le prime ore della giornata e ridursi alla sera, mentre per altri può succedere l'opposto. Proprio perché non si manifesta in maniera uguale per tutti e non è identificabile da segnali ben precisi, la fatica può creare molto disagio ai pazienti quando viene giudicata come svogliatezza, andando quindi a colpire anche l'aspetto mentale delle persone affette da sclerosi multipla.⁹

4.2 Dolore

Viene spesso associato alla fatica e solitamente si manifesta in maniera transitoria durante una ricaduta, per poi scomparire con la regressione. Tuttavia, è un sintomo che tende a divenire cronico in relazione alla progressione della patologia.¹⁰ Ci sono tipi di dolore direttamente provocati dalla sclerosi multipla, a causa dei danni ai nervi del sistema nervoso centrale, e dolori

secondari correlati ad altre problematiche della patologia, come scompensi fisici dovuti alla difficoltà di camminare in posizione perfettamente eretta. L'Organizzazione Mondiale della Sanità definisce il dolore come "un'esperienza sensoriale ed emozionale spiacevole associata a danno tissutale, in atto o potenziale, o descritta in termini di danno". I pazienti con sclerosi multipla possono soffrire di dolore di tipo **acuto** o **cronico**; la **neuralgia del trigemino** è il tipo di dolore acuto più comune nelle persone con sclerosi multipla. Costituisce in un dolore di durata molto breve che si manifesta come una scossa elettrica, distribuito a carico di una o più branche trigeminali. Si pensa che alla base del fenomeno doloroso ci sia una placca demielinizzata a livello della zona di ingresso della radice del quinto nervo cranico. Le **disestesie**, invece, sono sensazioni dolorose che colpiscono gli arti e provocano sensazioni di bruciore e pizzicore, andando ad interferire con le attività quotidiane e la qualità generale di vita. Il dolore di tipo cronico che si registra più comunemente è invece quello di **natura neuropatica** che colpisce gli arti ed il tronco; purtroppo, la terapia per trattarlo non è completamente efficace, ecco quindi che subentrano alcune pratiche di tipo non farmacologico come la fisioterapia o tecniche riabilitative, che possono contribuire a migliorare la postura e ad intervenire su eventuali cause che scatenano il dolore. ¹¹

4.3 Spasticità

È uno dei sintomi che penalizzano maggiormente i pazienti affetti da sclerosi multipla, perché contribuisce ad aumentare considerevolmente la disabilità complessiva della patologia. Alcuni sintomi come la rigidità muscolare, il dolore, la stipsi o le infezioni alle vie urinarie possono influenzarla negativamente ed aumentarne la gravità; ciò rende la spasticità uno dei sintomi più disabilitanti della sclerosi multipla, per questo è importante individuare e tenere sempre monitorati i fattori che possono peggiorarne l'evoluzione. La spasticità registra una prevalenza nella patologia del **60%**; questa percentuale può salire al 75% se la sclerosi multipla è stata diagnosticata da almeno 15 anni. ¹² Il sintomo deriva da un danno neuronale nelle fibre lunghe del sistema nervoso centrale, ed è un disturbo motorio caratterizzato da un aumento velocità-dipendente dei riflessi e da scatti tendinei esagerati. ¹³

4.4 Disturbi visivi

I disturbi visivi sono frequenti nella sclerosi multipla e comprendono problemi sia delle vie visive afferenti che di quelle efferenti, influenzando in questo modo sia come i soggetti colpiti osservano l'ambiente circostante, sia il modo in cui gli occhi si muovono insieme. ¹⁴ La perdita della vista ha un forte impatto sulla percezione della qualità della vita nella SM e i disturbi visivi, pur essendo frequenti, spesso non vengono segnalati perché non sono evidenti per i pazienti; il che significa che i medici devono cercare di esaminare a fondo ed identificare in maniera precisa la

localizzazione dei possibili problemi legati alla vista, anche attraverso un monitoraggio regolare che punti a migliorare la qualità di vita dei pazienti.¹⁵

A seconda dell'area cerebrale interessata dal processo infiammatorio, i disturbi visivi nella sclerosi multipla possono essere classificati in 3 tipi: neurite ottica, diplopia e nistagmo. La **neurite ottica** è la manifestazione dell'alterazione visiva afferente più comune della SM, dalla quale il recupero visivo è spesso incompleto.¹⁴ È il risultato di un processo di demielinizzazione a carico del nervo ottico, ossia della struttura responsabile della trasmissione delle informazioni visive dalle cellule gangliari della retina alle aree corticali.

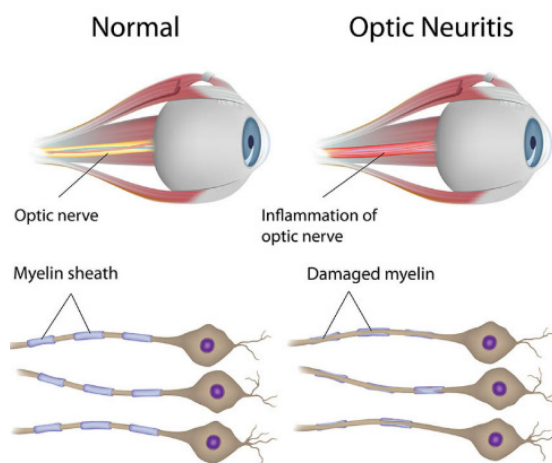


Figura 21: Principio di demielinizzazione alla base della neurite ottica

L'infiammazione del nervo ottico compare come primo sintomo della sclerosi multipla nel **20%** dei pazienti, e le manifestazioni che la caratterizzano presentano un decorso che può portare a perdita unilaterale della vista, dolore al movimento degli occhi e alterazione della visione dei colori. La perdita della vista si sviluppa tipicamente nell'arco di ore o giorni e può variare da un'alterazione visiva leggermente ridotta alla perdita della capacità di rilevare la luce. La neurite ottica acuta nella sclerosi multipla è spesso autolimitante; solitamente, quasi tutti i pazienti sperimentano un miglioramento della funzione visiva entro tre settimane, anche se alcuni presentano sintomi a lungo termine.¹⁵

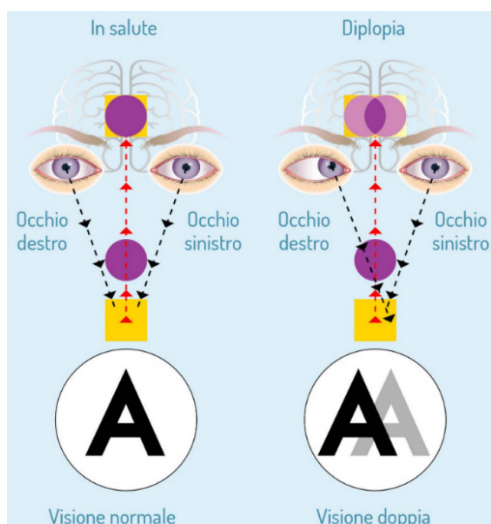


Figura 22: Effetti sulla vista nei soggetti che soffrono di diplopia

Il danno alle fibre nervose provenienti dai nuclei del tronco encefalico e del cervelletto può portare a disturbi della motilità oculare ma, mentre il recupero quasi completo è comune dopo una neurite ottica acuta, spesso si generano sintomi oculari persistenti come la **diplopia**.¹⁵ Il processo di demielinizzazione che colpisce le vie nervose responsabili del controllo dei movimenti oculari provoca questo sintomo, che si manifesta sotto forma di sdoppiamento della vista.¹⁶ La diplopia può verificarsi temporaneamente e risolversi senza ricorrere ad alcun trattamento, ma in alcuni casi può diventare persistente e provocare grande disagio nella persona colpita.

Un terzo disturbo della vista piuttosto comune nei pazienti con sclerosi multipla si verifica se la lesione interessa le vie vestibolari; in questo caso il soggetto sviluppa **nistagmo**, una serie di movimenti ritmici dei globi oculari che si manifestano in particolar modo quando lo sguardo è rivolto lateralmente. Essi vengono associati anche ad una ridotta capacità di mantenere lo sguardo fisso su qualcosa.^{15, 16}

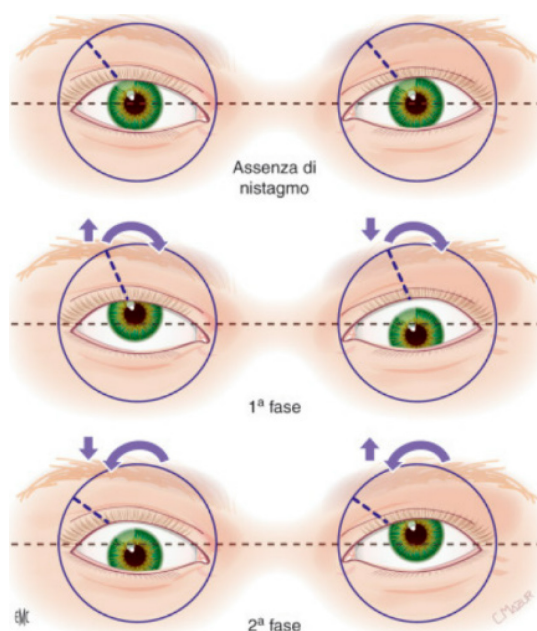


Figura 23: Fasi della manifestazione di nistagmo

4.5 Disturbi della sensibilità

I disturbi della sensibilità comprendono una serie di alterazioni che possono svilupparsi in qualsiasi parte del corpo, le quali tendono a regredire e a ripresentarsi successivamente.

Tra i disturbi della sensibilità è facile riscontrare le sensazioni di formicolio, di puntura, di intorpidimento, di bruciore o di solletico, che si manifestano senza la presenza di un vero motivo scatenante e che prendono il nome di **parestesie**, le quali possono condurre alla sensazione di dolore o all'incapacità di riconoscere gli oggetti per mezzo del tatto. Anche l'alterazione della capacità di percepire il caldo e il freddo è un sintomo che si sviluppa comunemente.¹⁵ A seconda della localizzazione della parestesia, può svilupparsi un'alterazione della funzionalità della parte del corpo interessata, rendendo difficili anche normali attività di vita quotidiana; se, ad esempio, vengono colpite le mani, il soggetto avrà difficoltà a vestirsi oppure a scrivere; al contrario, se la parestesia danneggia i piedi, potrebbero essere compromesse la postura e la camminata.¹⁷

4.6 Disturbi vescicali

La disfunzione vescicale sintomatica si manifesta prima o poi nella maggior parte dei pazienti con sclerosi multipla. Circa l'**80%** dei pazienti con SM presenta sintomi neuro-urologici entro 10 anni dalla diagnosi; ciò può spiegare come i disturbi vescicali siano rari nelle fasi di esordio della malattia, ma diventino piuttosto comuni con l'evoluzione del quadro patologico.¹⁸ La gravità dei sintomi è spesso correlata al grado di coinvolgimento del midollo spinale, quindi al livello generale di disabilità del paziente.¹⁹

I disturbi urinari solitamente si manifestano come urgenza minzionale, ossia il bisogno impellente di urinare; in alcuni casi lo svuotamento della vescica non è completo e, quindi, il paziente può sviluppare ritenzione urinaria. Il decorso recidivante-remittente e la progressiva perdita di mobilità associati alla sclerosi multipla rendono difficile la gestione dell'urgenza urinaria e dell'incontinenza. La valutazione da parte di uno specialista serve come linea guida per un trattamento appropriato: dopo una diagnosi accurata della disfunzione vescicale, viene sviluppato un programma di gestione che può prevedere l'utilizzo di tecniche di minzione, cateterismo intermittente, trattamento chirurgico e altre misure aggiuntive. Gli obiettivi del trattamento sono la protezione e la conservazione della funzione renale, l'alleviamento della disfunzione di minzione sintomatica e la prevenzione di successive complicazioni urinarie.²⁰

4.7 Disturbi cognitivi

Il deterioramento cognitivo varia notevolmente tra i soggetti e si manifesta in tutte le fasi della sclerosi multipla. Rimane una delle principali cause di disabilità neurologica nei giovani e negli adulti di mezza età affetti dalla malattia. I disturbi neurocognitivi includono deficit delle funzioni esecutive, dell'attenzione, della memoria e del processamento delle informazioni²¹; è stimato che tra il **15%** ed il **25%** dei pazienti venga colpito da un'alterazione delle **funzioni esecutive**, definite come le abilità necessarie per mettere in atto un comportamento creativo, efficace e socialmente accettato. Tra il 20 e il 50% dei pazienti presenta invece un **deficit dell'attenzione**; le componenti dell'attenzione più colpite nella sclerosi multipla sono l'attenzione selettiva e quella divisa, che comportano difficoltà sia nella selezione delle informazioni che nella capacità di svolgere contemporaneamente compiti diversi. Al contrario, il livello di allerta e l'attenzione focalizzata sono componenti non così frequentemente compromesse. Le persone con sclerosi multipla riferiscono più frequentemente di avere difficoltà a seguire una conversazione o un programma televisivo, a continuare a svolgere un compito al lavoro, a riprendere una certa attività dopo un'interruzione o a mantenere l'attenzione su un particolare stimolo in presenza di altri stimoli concorrenti. Le difficoltà della **memoria** sono state riscontrate nel **40-65%** dei pazienti, con il 30% dei soggetti gravemente compromesso. Nella sclerosi multipla le alterazioni si

verificano soprattutto a livello della memoria esplicita, che ha a che fare con il ricordo e il recupero delle esperienze personali passate; viene invece generalmente conservata la memoria implicita, in cui le esperienze precedenti facilitano l'esecuzione di un compito che è stato ripetuto diverse volte e che è diventato ormai un automatismo. La **velocità di elaborazione delle informazioni** può essere compromessa nel 40-70% dei pazienti con SM. L'efficienza nell'elaborazione delle informazioni nella sclerosi multipla si riferisce sia alla memoria di lavoro, la quale permette di mantenere e gestire le informazioni per un breve periodo di tempo, sia alla velocità con cui è possibile eseguire una serie di operazioni cognitive.²²

4.8 Disturbi sessuali

Nelle fasi più tardive della patologia non è infrequente riscontrare disturbi sessuali, i quali si manifestano tra il **50** e il **90%** nel genere maschile e tra il **40** e l'**80%** nelle donne.²³ Nell'uomo solitamente comprendono problemi erettili correlati anche all'incapacità di eiaculare, a causa di un deficit di sensibilità nell'area genitale. Un problema simile si ripropone anche per il genere femminile: le donne, infatti, possono sperimentare una riduzione della sensibilità genitale, associata ad una diminuzione della lubrificazione e a sensazioni di dolore durante il rapporto.¹⁶ I disturbi di tipo sessuale possono essere suddivisi in tre categorie: la **disfunzione sessuale primaria**, che deriva dalla demielinizzazione delle aree cerebrali o del midollo spinale direttamente coinvolte nel controllo genitale, e si traduce nei sintomi di cui sopra; le **disfunzioni sessuali secondarie**, che si riferiscono a sintomi indiretti, che influenzano comunque l'esperienza sessuale, come dolore, affaticamento, debolezza, spasticità o scarsa capacità cognitiva; infine, le **disfunzioni sessuali terziarie**, che possono essere definite come gli aspetti psicologici, sociali e culturali derivanti da una malattia cronica, i quali possono interferire indirettamente anche con la vita sessuale. Uno dei problemi che accompagnano la disfunzione sessuale è l'associazione di quest'ultima con un altro importante sintomo della sclerosi multipla: la **depressione**. Viene infatti sostenuto che, soprattutto nei giovani pazienti, i disturbi sessuali possano potenzialmente avere un impatto più significativo in termini di salute mentale, autostima e qualità di vita rispetto alla somma dei deficit neurologici che comportano le difficoltà funzionali descritte precedentemente. In questi casi potranno essere utili percorsi di psicoterapia individuale con degli specialisti, oltre al confronto con il proprio medico, per capire come affrontare i problemi sessuali, ed eventualmente valutare anche la prescrizione di adeguati farmaci che possano aiutare il paziente.²⁴ Per l'appunto, una delle barriere più comuni che gli operatori sanitari si trovano ad affrontare quando cercano di trattare la disfunzione sessuale, è la mancanza di consapevolezza delle diverse strategie disponibili per la gestione dei problemi sessuali, nonché lo stigma che talvolta circonda questo tipo di problemi di salute.²

4.9 Disturbi della coordinazione

Tra i disturbi della coordinazione particolare importanza assume l'atassia, un sintomo che compare in oltre il **75%** dei soggetti con sclerosi multipla. È definibile come un'alterata coordinazione dei movimenti muscolari volontari, e può rappresentare il disturbo principale oppure una componente di altri sintomi, come il tremore. Entrambi sono problematiche difficili da trattare e tra le più disabilitanti della sclerosi multipla. L'**atassia** è solitamente causata da una disfunzione cerebellare o da un'alterazione dell'input che arriva al cervelletto, ma il sintomo che compare dipende dal tipo e dalla localizzazione delle lesioni all'interno del sistema nervoso centrale: lesioni dell'emisfero cerebellare producono atassia degli arti; le lesioni del vermis causano atassia troncale e dell'andatura, con gli arti relativamente risparmiati, mentre quelle vestibolo-cerebellari causano problemi di equilibrio o vertigini. L'atassia può avere un esordio che porta ad un decorso cronico e lentamente progressivo, anche se in questo caso potrebbe essere causata non solo da malattie cerebellari neurodegenerative o ereditarie, ma anche da neoplasie e infezioni croniche. Può manifestarsi anche con un esordio acuto, in particolare se deriva da infarto cerebellare, emorragia o infezione; questo tipo di quadro patologico può avere una rapida progressione portando anche ad effetti di importante gravità.

Le lesioni alle vie vestibolari hanno come chiara conseguenza l'insorgenza di un altro sintomo: le **vertigini**, classificate come disturbi dell'equilibrio. Questi, assieme alle sensazioni di instabilità durante la deambulazione, al tremore e alle alterazioni della fluidità dei movimenti, sono disturbi della coordinazione frequenti nella sclerosi multipla.²⁵

4.10 Disturbi del linguaggio

I disturbi della coordinazione possono assumere anche la forma di disturbi del linguaggio, che si manifestano come disartria o disfonia; spesso sono presenti entrambi i sintomi contemporaneamente, perché i muscoli e le reti neurali che vengono coinvolti sono gli stessi sia per produrre le parole sia per emettere il suono della voce. La **disartria** è un'alterazione della capacità di articolare adeguatamente le parole, mentre la **disfonia** è classificata come un disturbo della voce. Fortunatamente, però, il linguaggio è solo raramente compromesso, in quanto le abilità verbali di base (espressione e comprensione) sono spesso conservate, ad eccezione di occasionali difficoltà di denominazione. Se ci sono problemi di comprensione verbale, questi sembrano essere più legati a difficoltà nell'elaborazione delle informazioni o nella memoria di lavoro, mentre le afasie, ovvero le incapacità di esprimersi mediante la parola o la scrittura o di comprendere il significato delle parole dette o scritte da altri, sono poco frequenti nei soggetti affetti da sclerosi multipla.²²

4.11 Depressione

Come emerso in precedenza parlando di disturbi sessuali ed intestinali, la depressione risulta un sintomo comune e spesso associabile ad altre problematiche che si sviluppano nei pazienti affetti da sclerosi multipla. È caratterizzata da una serie di sintomi che si protraggono nel tempo e possono diventare cronici: si registra una perdita di interesse nelle attività quotidiane, l'energia è ridotta, possono comparire disturbi del sonno come anche una perdita generale dell'appetito. Tutto ciò nel suo insieme può portare il paziente, soprattutto quello diagnosticato con sclerosi multipla, ad avere **pensieri suicidari** e di morte, i quali vanno in tutti i modi scoraggiati ed evitati anche tramite la terapia farmacologica. In alcuni casi la depressione è dovuta ad un vero e proprio processo patologico determinato dal danno neuronale a livello del sistema nervoso centrale, che porta allo sviluppo di un cambio emozionale nel soggetto; nella maggior parte dei casi, però, la sindrome depressiva è correlata ad altre problematiche presenti nella sclerosi multipla, che influenzano notevolmente la vita quotidiana e lo stato psicologico del paziente. In alcuni casi un fattore scatenante la depressione può essere la reazione alla diagnosi di sclerosi multipla: una persona che si vede diagnosticata una patologia autoimmune così disabilitante potrebbe reagire sviluppando stati emotivi depressivi che possono accompagnarla anche per molti mesi. È importante saper riconoscere il sintomo della depressione e trattarlo con una terapia farmacologica appropriata, ma anche affidandosi ad attività di psicoterapia di varie tipologie, come ad esempio la partecipazione a gruppi di sostegno o la terapia cognitivo-comportamentale.

26

4.12 Disturbi intestinali

I disturbi intestinali includono svariate manifestazioni che vanno dalla stipsi all'incontinenza fecale. Questi rappresentano sintomi molto imbarazzanti per il malato di sclerosi multipla, che, come conseguenza, potrebbe cadere in depressione e sviluppare altri problemi a livello psicologico. La **stipsi** è correlata ad anomalie nella funzionalità dei muscoli rettali e ad un rallentato transito nel colon, ma anche la scarsa attività fisica può contribuire allo sviluppo del sintomo. In questi casi può senza dubbio aiutare una dieta ricca di fibre, la quale favorisce una corretta consistenza delle feci ed aiuta a combattere il problema. L'**incontinenza fecale** è collegata ad una riduzione della sensibilità a livello rettale oppure ad una minor capacità di contrarre lo sfintere anale. Oltre agli approcci farmacologici, i quali dovrebbero essere sempre gestiti correttamente e utilizzati solo quando strettamente necessario, alcune buone abitudini di vita quotidiana come assumere una quantità adeguata di liquidi, seguire una dieta ricca di fibre e praticare attività fisica quotidianamente, possono contribuire ad alleviare i disturbi intestinali e migliorare la situazione del malato di sclerosi multipla. ²

4.13 Sintomi meno comuni

Oltre ai classici sintomi della sclerosi multipla che si manifestano nella maggior parte dei soggetti, in alcuni casi possono comparire anche sintomi meno comuni, che colpiscono una percentuale minore di persone ma che, quando sono presenti, possono ugualmente compromettere la vita quotidiana. Essi sono:

- **Cefalea:** può colpire ogni parte della testa e nei pazienti con sclerosi multipla si presenta con frequenza maggiore rispetto al resto della popolazione; può avere dei risvolti psicologici che possono portare anche allo sviluppo di depressione o ansia
- **Disfagia:** nella sclerosi multipla si riscontra con una frequenza del **30%**; può essere definita come difficoltà a deglutire, quindi ad eseguire le contrazioni dei muscoli della bocca che permettono il passaggio del cibo verso lo stomaco. La gravità del sintomo dipende dalla fase della patologia, poiché è stata riscontrata più frequentemente negli stadi progressivi
- **Disturbi della respirazione:** possono verificarsi a causa della perdita di forza e resistenza muscolare a livello dei muscoli respiratori del torace e dell'addome, a causa del danno provocato dalla patologia; la respirazione è però controllata dal sistema nervoso autonomo, la parte del SNC che difficilmente viene colpita dalla sclerosi multipla; ecco perché i disturbi della respirazione sono sintomi rari nei pazienti affetti dalla patologia
- **Disturbi vascolari:** possono essere causati dalla scarsa mobilitazione e dalla sedentarietà che caratterizzano le persone che soffrono di SM, e si manifestano in circa l'**11%** dei soggetti. Comprendono fenomeni che vanno dall'edema venoso fino anche alla trombosi venosa profonda, ma in generale il sintomo che si riscontra maggiormente è rappresentato dal gonfiore di piedi e caviglie, poiché in queste zone il fluido linfatico non scorre correttamente.
- **Problemi di udito:** colpiscono circa il **6%** delle persone con sclerosi multipla e sono causati da lesioni delle vie acustiche a livello del tronco encefalico, che determinano la manifestazione anche di altri sintomi, come problemi alla vista o di coordinazione
- **Epilessia:** è raro che si verificano crisi epilettiche in un malato di sclerosi multipla, infatti esse colpiscono solo il **5%** dei pazienti. La presenza di attacchi di epilessia può determinare l'insorgere di depressione o ansia nella persona, ecco quindi che possono essere d'aiuto programmi di supporto psicologico o l'apprendimento di tecniche che aiutino a gestire lo stress.

5. TERAPIE CONSOLIDATE

Ad oggi, purtroppo non esiste un trattamento farmacologico in grado di eliminare la patologia e di portare alla guarigione la persona affetta da sclerosi multipla; tuttavia, negli ultimi anni la ricerca ha fatto grandi passi avanti nello sviluppo di farmaci capaci di ridurre la severità dei sintomi e permettere così ai pazienti di ottenere una qualità di vita migliore. Gli obiettivi che si pongono le terapie farmacologiche sono principalmente la riduzione della gravità e della durata delle recidive, permettendo al paziente di gestire al meglio gli attacchi acuti, cercando anche di ritardare il più possibile la progressione della malattia. Poiché le cause che scatenano la sclerosi multipla non sono ancora del tutto note, è molto difficile agire direttamente sui fattori eziologici che provocano la malattia; è invece attuabile con maggior agevolezza un trattamento che vada a influenzare i meccanismi autoimmuni alla base del disturbo, anche perché negli anni sono state accumulate maggiori evidenze empiriche che ne arricchiscono le conoscenze.¹⁶

L'approccio terapeutico quando si ha un paziente che soffre di sclerosi multipla prevede l'utilizzo di diversi farmaci, a seconda del quadro clinico della patologia e dell'effetto che si vuole ottenere tramite il loro impiego. Un primo tipo di terapia consiste nel trattare le ricadute gestendole con farmaci che vengono utilizzati nelle cosiddette terapie d'attacco. Un secondo approccio comprende l'attenuare i processi autoimmunitari che stanno alla base del disturbo, quando la patologia è consolidata e la disabilità progredisce nel tempo; in questo caso la terapia è a lungo termine e i farmaci impiegati mirano anche a ridurre la frequenza con la quale si presentano le recidive nel paziente. Infine, il trattamento sintomatico è la cura che prevede l'impiego di farmaci che non hanno effetto sui meccanismi fisiopatologici che scatenano la sclerosi multipla, piuttosto mirano a trattare direttamente i sintomi che accompagnano la persona durante il decorso della malattia.

È bene ricordare che nel trattamento della sclerosi multipla è di fondamentale importanza anche la terapia non farmacologica, volta a ridurre il più possibile la disabilità, migliorando la qualità di vita del malato. Per questi motivi la riabilitazione è un'attività che deve essere sempre associata alla terapia con farmaci, in quanto rappresenta un percorso che porta benefici non solo a livello fisico, ma anche psicologico e sociale. È stato scientificamente provato che la riabilitazione nella SM possa migliorare considerevolmente le performance motorie e cognitive, alleviare i sintomi e ridurre la disabilità. Già dal momento in cui viene diagnosticata, la sclerosi multipla inizia a manifestarsi con i primi sintomi, che progrediscono nel tempo; l'attività riabilitativa necessaria dipende quindi dallo stadio della malattia e dal tipo di sintomi che si manifestano nel soggetto malato, ma è indicata qualunque siano la forma e il tipo di manifestazione della patologia. Esempi di riabilitazione che vengono proposti ai pazienti sono la fisioterapia, la logopedia, ma anche il supporto psicologico ed il reinserimento sociale.

5.1 Terapie d'attacco

Il trattamento delle ricadute, gli attacchi acuti che si manifestano con un peggioramento dei sintomi o la comparsa di sintomi nuovi, prende il nome di “terapia d'attacco”; in particolare, si cerca di ridurre l'infiammazione causata dall'eccessiva ed incontrollata risposta immunitaria somministrando farmaci antiinfiammatori, in particolare il **Metilprednisolone**. La somministrazione avviene attraverso iniezione intramuscolare o endovenosa oppure tramite la via orale. La terapia con farmaci cortisonici ha quindi l'obiettivo di alleviare i

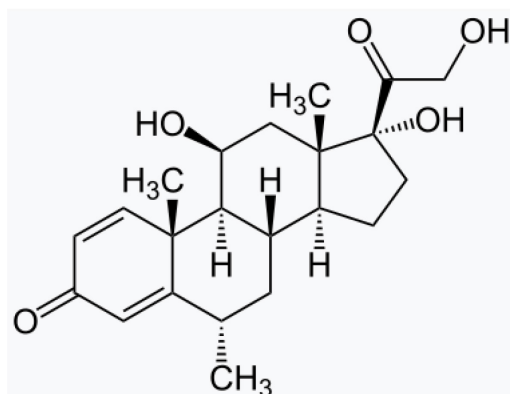


Figura 24: Formula chimica del Metilprednisolone

sintomi dell'attacco acuto e placare la recidiva, fino alla comparsa di un nuovo episodio. Per questo motivo gli antiinfiammatori steroidei vengono utilizzati perlopiù per breve durata, sfavorendo la comparsa di effetti collaterali di grave entità; per gestire i disturbi gastrici che possono insorgere attraverso l'utilizzo del Metilprednisolone spesso è consigliata l'associazione di quest'ultimo con un **farmaco gastroprotettore**.²

5.2 Disease-modulatory therapies

Le disease-modulatory therapies (DMTs) sono i trattamenti a lungo termine approvati per la sclerosi multipla, i quali vanno ad agire sui meccanismi immunopatologici alla base della malattia, modificando il decorso della stessa. L'obiettivo è sempre quello di cercare di diagnosticare la patologia il prima possibile, andando poi ad agire tempestivamente all'esordio della stessa, in modo da ridurre al massimo il danno agli assoni e alla mielina. Fino agli ultimi anni Ottanta l'unico trattamento farmacologico approvato per la sclerosi multipla prevedeva la somministrazione di farmaci antiinfiammatori steroidei durante gli attacchi acuti; durante i decenni successivi sono stati condotti numerosi studi sulla patologia, che hanno portato allo sviluppo di diversi trattamenti, i quali ad oggi permettono una gestione migliore del decorso della patologia. Gli studi effettuati sull'**encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE)** nel modello animale hanno portato ad una migliore comprensione di alcuni aspetti della fisiopatologia della sclerosi multipla, e in alcuni casi hanno contribuito a sviluppare le attuali terapie utilizzate nella patologia.²⁸ Nella EAE è stato visto come i linfociti T helper autoreattivi portino allo sviluppo di un disturbo infiammatorio demielinizzante simile alla sclerosi multipla. Tuttavia, diversi trattamenti che hanno avuto successo nell'encefalomielite hanno poi fallito nei modelli di SM, sottolineando come la patologia sia caratterizzata da una patogenesi più complessa ed

articolata.²⁸ Un dato patologico fondamentale nella sclerosi multipla è l'accumulo cronico di lesioni demielinizzanti all'interno del sistema nervoso centrale, che possono essere visualizzate mediante **risonanza magnetica**.²⁹

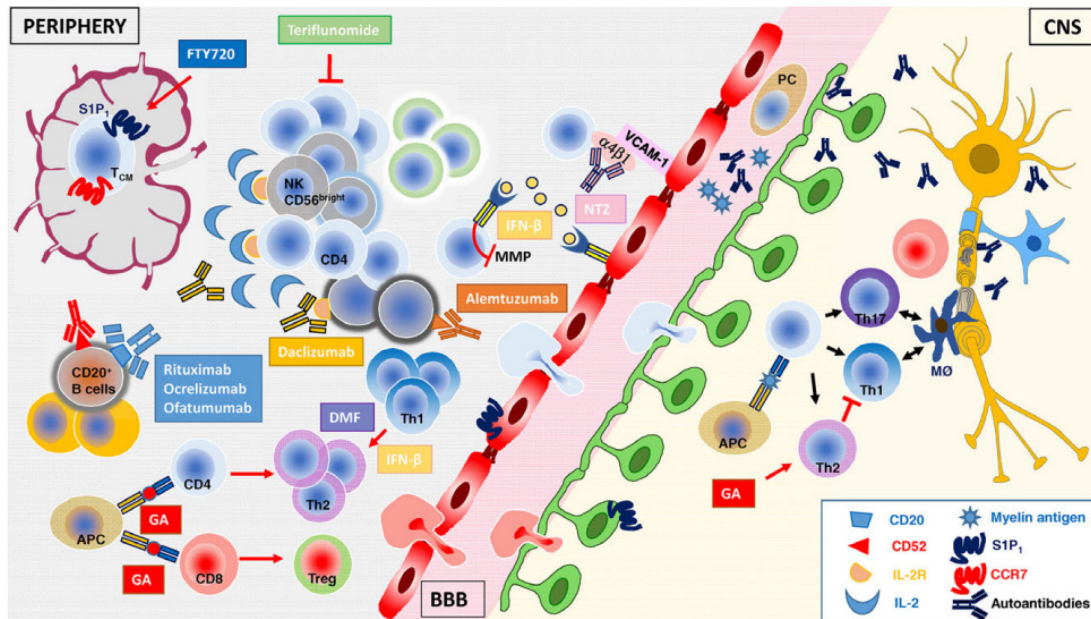


Figura 25: Rappresentazione schematica dei DMTs e dei loro bersagli d'azione nel trattamento della SM; FTY720=Fingolimod, NTZ=Natalizumab, DMF=Dimetilfumarato, GA=Glatiramer acetato

Come si può notare dall'immagine sottostante (figura 26)²⁹, nella maggior parte dei pazienti, la sclerosi multipla nasce come malattia recidivante-remittente, sottoforma di **sindrome clinicamente isolata** (CIS). Questa è spesso preceduta da una fase di attività di malattia subclinica, che può essere rilevata attraverso risonanza magnetica (nel grafico le stelle gialle indicano segni di infiammazione visibili tramite risonanza). Nelle fasi successive della malattia, i pazienti cominciano ad accumulare disabilità che progredisce nel tempo, già poco dopo la diagnosi. La componente progressiva alla base della sclerosi multipla diventa sempre più pronunciata negli anni, convertendo la malattia nella forma **secondariamente progressiva** (SPMS). Con il tempo l'attività infiammatoria della patologia diminuisce, come è possibile dedurre dalla minore frequenza di attacchi e di attività alla risonanza magnetica; ciò è dovuto ad un cambiamento nella risposta immunitaria dell'organismo, che passa da meccanismi adattativi a processi di tipo innato. Questo fenomeno potrebbe spiegare la perdita di efficacia dei trattamenti modulanti la malattia (DMTs) nel corso del tempo.

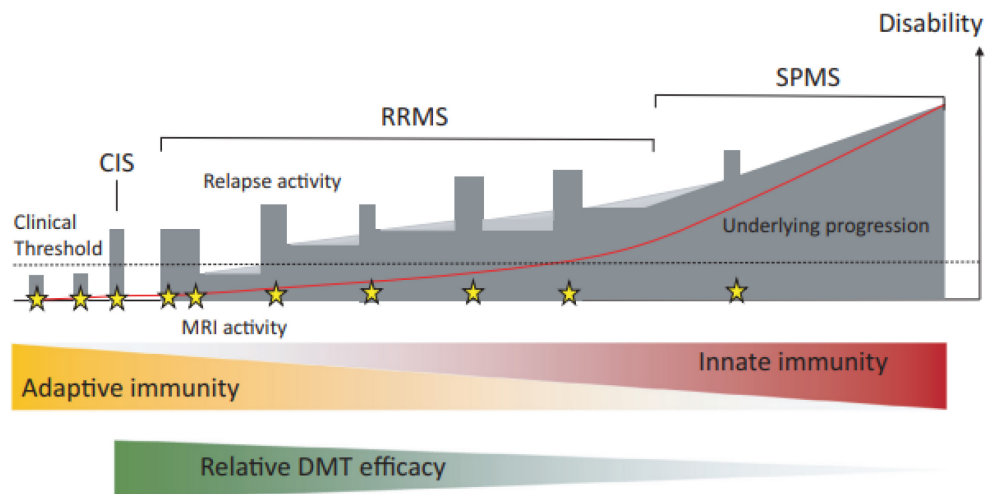


Figura 26: Decorso ed evoluzione della SM nel tempo in funzione della disabilità

Alcuni tipi di DMTs vengono impiegati come primo approccio alla patologia, quando essa si presenta nella forma recidivante-remittente. Questi farmaci di prima linea sono gli Interferoni, il Dimetilfumarato, la Teriflunomide e il Glatiramer acetato.

5.3 Interferone

Gli interferoni disponibili per il trattamento della sclerosi multipla sono le varianti 1b e 1a dell'**Interferone- β** , anche se la seconda è stata immessa in commercio più tardi della prima, la quale è stata il primo farmaco prodotto e successivamente approvato per la sclerosi multipla recidivante-remittente. Questi immunomodulatori di natura glicoproteica vengono fisiologicamente prodotti dall'organismo in quantità molto ridotte e hanno un effetto antiinfiammatorio; i meccanismi d'azione più importanti dell'Interferone- β prevedono: il blocco del passaggio dei linfociti T attraverso la BEE, la regolazione negativa del MHC di classe II e della presentazione dell'antigene a carico dei linfociti B o cellule gliali e l'inibizione della produzione di citochine proinfiammatorie.²⁸ Tutti questi eventi comportano una riduzione dell'infiammazione a livello centrale, determinando un abbassamento dell'indice di ricadute di circa il **30-40%** confrontato con placebo, generando sollievo nei pazienti trattati, a fronte di una molecola che è comunque molto ben tollerata dall'organismo.²⁹ Nei pazienti con RRMS, l'Interferone- β ha dimostrato di poter prolungare il tempo che intercorre tra inizio della terapia e prima ricaduta, riducendo anche la frequenza e la gravità delle recidive ed il numero di ospedalizzazioni.¹⁶ I farmaci contenenti interferoni utilizzati nella sclerosi multipla ed attualmente in commercio sono **Avonex** e **Rebif** per quanto riguarda l'IFN- β 1-a, **Betaferon** e **Extavia** per l'IFN- β 1-b.

Più recente è l'approvazione di **Plegridy**, IFN- β 1-a pegilato: l'aggiunta di un rivestimento di **polietilenglicole** permette di allungare la durata d'azione, consentendo quindi di somministrare il farmaco con minor frequenza. Le evidenze cliniche di Plegridy sono state accertate tramite uno **studio di fase III**, durante il quale la somministrazione sottocutanea per due volte al mese del farmaco ha dimostrato una riduzione dell'indice di ricadute del **36%** confrontato con placebo.²⁹



Figura 27: Flaconcino contenente INF- β 1-b (Betaferon) da prelevare e iniettare tramite somministrazione sottocutanea

5.4 Glatiramer acetato

Glatiramer acetato (**GA**) è anch'esso un immunomodulatore utilizzato per il trattamento della sclerosi multipla recidivante-remittente. L'approvazione di questo farmaco è correlata ad uno **studio di fase III** nel quale è stato confrontato con placebo in pazienti affetti da RRMS.²⁹ È un copolimero proteico caratterizzato da una specifica combinazione degli amminoacidi glutammato, lisina, alanina e tirosina disposti in ordine sparso, che mima la struttura della **proteina basica della mielina**. Sfruttando questa somiglianza strutturale, il farmaco va a sostituirsi agli antigeni mielinici come bersaglio del sistema immunitario, preservando l'integrità della guaina mielinica che avvolge gli assoni. Negli studi effettuati su modelli animali, Glatiramer acetato ha migliorato il quadro patologico dell'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE); in particolare, è stato osservato come il farmaco abbia la capacità di interferire con la presentazione dell'antigene ai linfociti T, spostando anche la risposta proinfiammatoria ad immunomodulante, andando ad indurre l'azione dei linfociti T regolatori. Un altro effetto benefico della molecola appartiene alla capacità di spostare il fenotipo delle cellule della microglia da M1 a M2, sfavorendo perciò l'attività macrofagica ed infiammatoria di queste cellule, la quale viene sostituita dalla produzione di citochine antiinfiammatorie che attenuano la risposta immunitaria. Allo stesso modo degli interferoni, anche Glatiramer acetato ha bisogno di

essere somministrato per via sottocutanea e viene tollerato molto bene dall'organismo. Le specialità del farmaco attualmente in commercio sono **Copaxone** e **Copemyl**.²⁸



Figura 28: Confezione di Glatiramer acetato (Copaxone) in penne preriempite da 40 mg

5.5 Teriflunomide

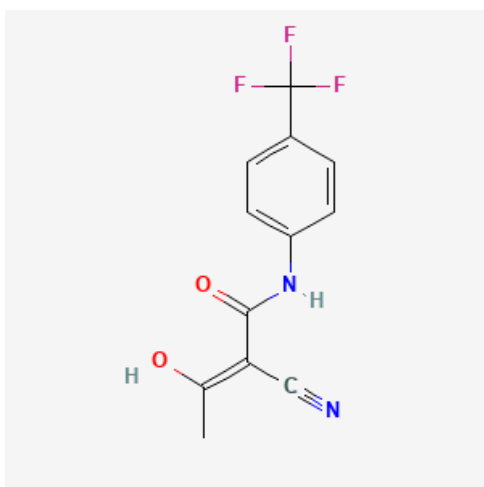


Figura 29: Struttura chimica di Teriflunomide

Teriflunomide è stato approvato nel 2012 come farmaco per via orale nel trattamento della RRMS. Solitamente viene utilizzato in quei pazienti neo diagnosticati con sclerosi multipla che non possono essere trattati con Interferone o Glatiramer acetato, oppure nel caso in cui quest'ultimi abbiano registrato effetti avversi o siano stati inefficaci. Teriflunomide è il metabolita attivo di Leflunomide e fa parte degli inibitori dell'enzima **diidroorotato deidrogenasi**, proteina coinvolta nella sintesi dei nucleotidi pirimidinici. Inibendo l'ossidoreduttasi, il farmaco riduce la proliferazione di cellule come i linfociti T

attivi, che necessitano della sintesi de novo della pirimidina per espandersi. Gli eventi avversi che potrebbero verificarsi in seguito alla somministrazione del farmaco includono infezioni delle alte vie respiratorie, diarrea, nausea, aumento di aminotransferasi, riduzione dei leucociti presenti nel sangue e aumento della pressione sanguigna. Teriflunomide è indicato solo per il trattamento di pazienti adulti affetti da RRMS, in quanto non è stato studiato per il trattamento delle forme progressive di sclerosi multipla. L'approvazione del farmaco è avvenuta in seguito all'analisi di due **studi di fase III**, nei quali sono state confrontate dosi da 7 e 14 mg di Teriflunomide con

placebo. Il farmaco ha registrato una diminuzione dell'indice di ricadute compresa tra il **22** ed il **36%**.²⁹ Teriflunomide presenta un profilo farmacocinetico complesso che prevede il reuptake della molecola a livello enteropatico, provocando la permanenza di concentrazioni significative del farmaco a livello plasmatico, anche per diversi mesi dall'interruzione della somministrazione. Dal punto di vista della sicurezza, a causa di una sospetta teratogenicità, è sconsigliata la somministrazione in donne in gravidanza.²⁹

5.6 Dimetilfumarato

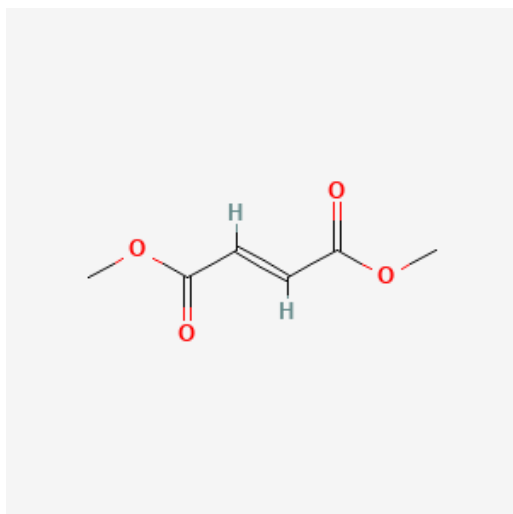


Figura 30: Struttura chimica di Dimetilfumarato

Dimetilfumarato (**DMF**) fa parte dei composti derivati dall'**acido fumarico**; come farmaco per la sclerosi multipla recidivante-remittente è stato approvato nel 2013. Il meccanismo d'azione di DMF prevede un'alterazione della risposta immunitaria mediata dalle cellule della difesa, tramite uno spostamento da reazione infiammatoria ad antinfiammatoria, favorita dai **linfociti Th2**. Il farmaco incrementa anche gli effetti provocati dai processi ossidativi, in quanto va ad agire sul **fattore di trascrizione nucleare eritroide-2 (NrF2)**, molecola chiave con ruolo di protezione delle cellule immunitarie dallo stress ossidativo. Sono

stati effettuati due **studi di fase III** nei quali è stato analizzato il confronto tra farmaco e placebo; i risultati hanno delineato una riduzione dell'indice di ricadute pari al **45%** nel primo studio e del **53%** nel secondo. Purtroppo, il Dimetilfumarato non è molto ben tollerato, in quanto è comune la comparsa di effetti indesiderati come diarrea, dolore addominale e arrossamento, anche se dopo il primo mese di trattamento la frequenza con la quale si presentano inizia a diminuire. L'effetto avverso più grave che potrebbe essere indotto dal farmaco è la **leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML)**, un'infezione virale caratterizzata da un danno progressivo o da un processo di infiammazione della sostanza bianca cerebrale, ma, fortunatamente, sono rari i casi che si verificano. In commercio è presente la specialità **Tecfidera** del farmaco.

Recentemente (gennaio 2022) AIFA ha approvato ed immesso in commercio il **Diroximel fumarato (Vumerity)**, un derivato di seconda generazione che ha il vantaggio di presentare effetti collaterali gastrointestinali di minor entità.^{28,29}



Figura 31: Confezione da 106 capsule di Vumerity (Diroximel fumarato)

Con l'evoluzione della patologia, i mutamenti nel quadro clinico conducono gradualmente a un fallimento della terapia di prima linea rendendo, di conseguenza, necessario il passaggio a una terapia a lungo termine basata sulla somministrazione dei cosiddetti farmaci "**di seconda linea**". Tra le terapie più comunemente somministrate sono presenti l'anticorpo monoclonale umanizzato Natalizumab e il modulatore dei recettori della sfingosina 1-fosfato (S1PR) Fingolimod.

5.7 Natalizumab

Natalizumab è un anticorpo monoclonale solitamente utilizzato nei casi di RRMS ad elevata attività. Nello specifico, la somministrazione avviene quando il paziente non ha risposto al ciclo terapeutico di almeno un anno con Interferone- β o Glatiramer acetato. Il meccanismo d'azione di Natalizumab consiste nell'inibire l'**integrina $\alpha 4 \beta 1$** ; quest'ultima è espressa in numerose cellule immunitarie, come linfociti T e B, monociti, cellule natural killer ed eosinofili. L'azione di questa molecola di adesione promuove una risposta infiammatoria da parte del sistema immunitario, in quanto favorisce il movimento dei leucociti verso i tessuti infiammati. Ha un ruolo chiave nell'adesione delle cellule e nella successiva entrata all'interno del sistema nervoso centrale, poiché permette ai globuli bianchi di attaccarsi alle pareti dei capillari che costituiscono la barriera ematoencefalica. Inibendo l'integrina, Natalizumab riduce il passaggio delle cellule immunitarie dirette verso la guaina mielinica che avvolge gli assoni. Il farmaco attualmente in commercio è conosciuto col nome di **Tysabri** ed è indicato per forme di sclerosi multipla recidivante-remittente ad elevata attività; in uno **studio di fase III** il farmaco ha determinato, rispetto al placebo, una riduzione del **69%** dell'incidenza di recidive, mostrando un'efficacia molto superiore rispetto a

farmaci come INF- β o GA. Natalizumab in generale è molto ben tollerato dall'organismo, ma anch'esso potrebbe indurre il grave effetto indesiderato della PML, che rimane un problema non trascurabile quando si devono trattare soggetti con questo farmaco.

5.8 Modulatori dei recettori della sfingosina 1-fosfato

Fingolimod è un immunosoppressore in grado di inibire la migrazione delle cellule immunitarie all'interno del sistema nervoso centrale. È stato il primo farmaco per la sclerosi multipla somministrabile per via orale. Il farmaco che si trova in commercio è **Gilenya**, e i suoi criteri di somministrazione sono sovrapponibili a quelli per Natalizumab, anch'esso infatti viene utilizzato nei pazienti con RRMS ad elevata attività. Fingolimod appartiene alla classe delle molecole capaci di interrompere il segnale attraverso i **recettori della sfingosina 1-fosfato (S1PRs)**, espressi da varie cellule, tra cui quelle immunitarie. Questi recettori sono accoppiati a **proteine G** e hanno la funzione di mediare il segnale extracellulare, il quale si traduce nella migrazione dei linfociti dai linfonodi alla circolazione sistemica. Fingolimod agisce legandosi ai recettori della sfingosina promuovendo la loro internalizzazione e degradazione, impedendo alle cellule linfocitarie di raggiungere il SNC. Ha un'efficacia minore nel ridurre la frequenza di recidive rispetto a Natalizumab, ma superiore nei confronti del GA e di INF- β , come dimostra uno **studio** che ha messo a confronto quest'ultimo con Fingolimod. In altri due **studi di fase III**, invece, il farmaco è stato confrontato con un placebo, e ha registrato una riduzione di ARR rispettivamente del **48%** e del **60%**. Gli effetti collaterali ai quali si può andare incontro somministrando Fingolimod sono sbilanciamenti nella conduzione cardiaca, aumento degli enzimi epatici e rischio di incorrere in alcune infezioni, come quelle da herpes virus.^{28, 29}

La famiglia dei recettori della sfingosina 1-fosfato (S1PRs) si compone di 5 membri; Fingolimod, è classificabile come modulatore **non selettivo** di questi recettori, poiché si lega indistintamente ad ogni membro e non è specifico per un tipo di proteina. Nel corso degli anni sono stati approvati per la sclerosi multipla anche alcuni derivati più specifici di Fingolimod, capaci di instaurare il legame solo con alcuni membri di S1PRs: **Siponimod**, Ponesimod ed Ozanimod. Il primo, approvato dall'Agenzia Europea del Farmaco (EMA) nel gennaio 2020 con il nome di **Mayzent**, è un modulatore selettivo per i **recettori 1 e 5**; è stato testato nella SPMS attraverso uno **studio di fase III** e ha registrato una diminuzione del rischio di progressione della disabilità. Il farmaco è infatti approvato per il trattamento delle forme secondariamente progressive di sclerosi multipla con malattia attiva evidenziata da recidive.²⁹

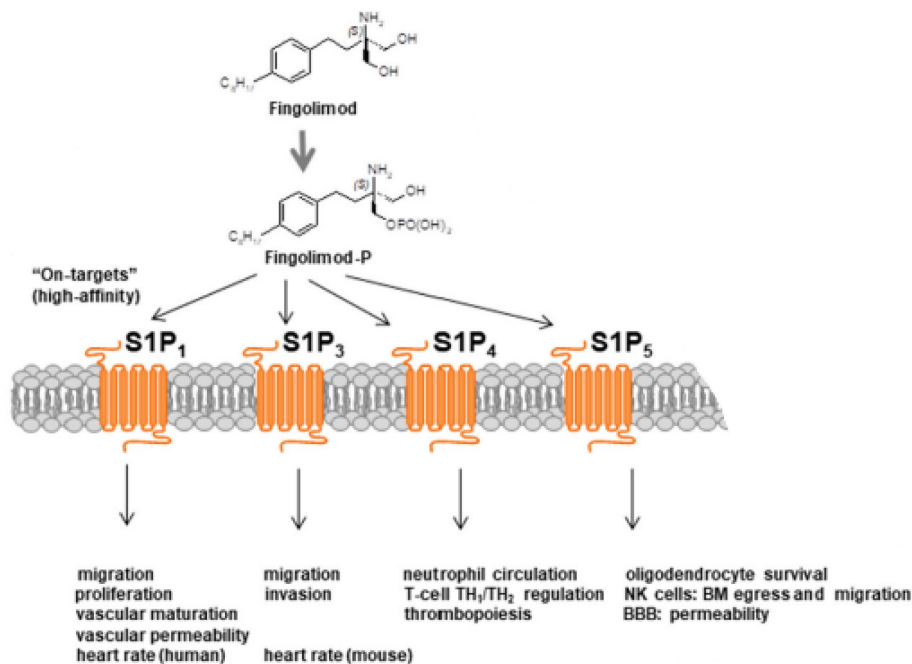


Figura 32: Effetti dell'attività agonista sui S1PRs

Ponesimod è invece selettivo solo per il recettore della sfingosina di **tipo 1** ed è commercializzato con il nome di **Ponvory**; uno studio lo ha analizzato ponendolo a confronto con la Teriflunomide, rispetto alla quale ha provocato una diminuzione del **30%** del rischio di incorrere in recidive. Il farmaco è stato approvato per il trattamento di pazienti adulti con forme recidivanti di sclerosi multipla.²⁹

Ozanimod modula con maggior affinità il **recettore 1**, ma possiede una debole attività anche nei confronti del **tipo 3**; la sua efficacia è stata valutata con due **studi di fase III** nei quali è stato confrontato con IFN- β , che hanno dimostrato come abbia causato una diminuzione di ARR (annualized relapse rate) rispettivamente del **39%** e del **49%**. In commercio è conosciuto con il nome di **Zeposia** ed è utilizzato nei pazienti che soffrono di sclerosi multipla recidivante-remittente con malattia in fase attiva.²⁹

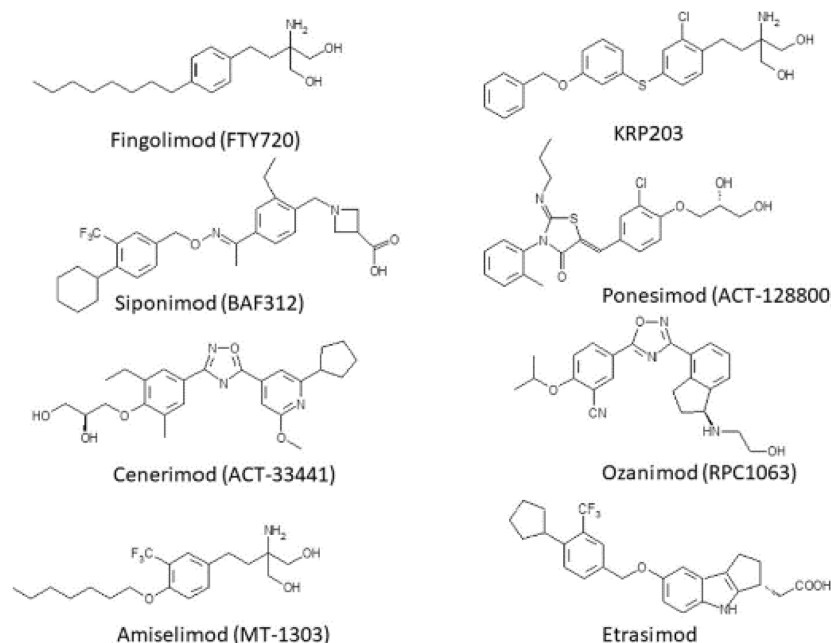


Figura 33: Strutture chimiche di alcuni modulatori dei S1PRs

5.9 Anti-CD52

Uno degli approcci terapeutici impiegati nel trattamento dei pazienti affetti da sclerosi multipla consiste nel colpire alcune proteine presenti sulla superficie delle cellule immunitarie implicate nei meccanismi proinfiammatori tipici della patologia. **Alemtuzumab** è un anticorpo monoclonale umanizzato che fu testato con successo nella sclerosi multipla recidivante-remittente, e approvato con il nome di **Lemtrada**. Il meccanismo d'azione del farmaco prevede il legame alla proteina **CD52** presente sui linfociti, dei quali determina la deplezione e, conseguentemente, favorisce un'attenuazione della risposta immunitaria. Alla deplezione segue un ripopolamento, che ha tempi differenti per le diverse popolazioni linfocitarie (più veloce per i linfociti B e più lento per i linfociti T); l'azione dell'anticorpo è quindi riferibile non solo alla distruzione dei linfociti, ma anche alla modalità con cui avviene la ripopolazione. Negli studi **Care-MS I e II di fase III**, randomizzati, controllati e della durata di 2 anni, sono stati arruolati adulti di età compresa tra i 18 e i 50 anni con sclerosi multipla recidivante-remittente. Ai partecipanti idonei sono state assegnate dosi di Alemtuzumab per via endovenosa o INF- β per via sottocutanea. I risultati hanno indicato come l'anticorpo avesse ridotto del **50%** la frequenza di recidive annuali. A causa dell'abbassamento delle difese immunitarie provocato dall'azione del farmaco, uno dei problemi che potrebbero insorgere dall'uso di Alemtuzumab riguarda i possibili effetti collaterali: purtroppo in alcuni pazienti può aumentare il rischio di incorrere in disordini autoimmuni secondari non legati alla sclerosi multipla, come la trombocitopenia o patologie autoimmuni a carico della tiroide. Ecco che si tende a somministrare questo anticorpo anti-CD52

solo quando i soggetti hanno precedentemente fatto uso di farmaci di prima o seconda linea che si sono dimostrati non tollerati o inefficaci.^{29, 30}



Figura 34: Confezione di Lemtrada e relativo flaconcino contenente Alemtuzumab da prelevare e iniettare tramite somministrazione endovenosa

5.10 Anti-CD20

La proteina **CD20** è espressa in grande quantità sulla superficie dei linfociti B in tutte le fasi di maturazione di queste cellule, tranne nelle cellule staminali linfoidi e nelle plasmacellule specializzate nella produzione di anticorpi. Per il trattamento della sclerosi multipla sono disponibili in commercio anticorpi che agiscono legandosi a CD20 e operando la lisi dei linfociti mediata dal sistema del complemento, riducendo così significativamente l'attività infiammatoria nella sclerosi multipla recidivante-remittente.²⁸

Ocrevus, nome commerciale dell'anticorpo anti-CD20 **Ocrelizumab**, è stato la prima terapia modulante la patologia approvata anche per la sclerosi multipla primariamente progressiva, come dimostra lo **studio Oratorio**, nel quale il farmaco è stato messo a confronto con placebo e ha registrato una diminuzione del **24%** nella progressione della disabilità.

Un altro anticorpo anti-CD20, commercializzato con il nome di **Kesimpta**, è **Ofatumumab**; viene utilizzato per il trattamento di forme di sclerosi multipla recidivanti ed è stato approvato dall'EMA nel 2021. I dati clinici che testimoniano la sua efficacia derivano da due **studi di fase III**, nei quali il farmaco è stato paragonato a Teriflunomide, rispetto alla quale è stata osservata una riduzione dell'incidenza di recidive del **50%** in uno studio e del **60%** nell'altro. Ocrelizumab ed Ofatumumab vengono somministrati rispettivamente tramite infusione endovenosa ed iniezione sottocutanea mensile, e potrebbero indurre gli effetti indesiderati non di grave entità

tipici degli anticorpi monoclonali: reazioni nella zona di somministrazione, prurito, eritema, vampate, capogiri.²⁹

Un terzo anticorpo monoclonale anti-CD20 è rappresentato da **Rituximab**, farmaco che è stato approvato per il linfoma non-Hodgkin, ma non per la sclerosi multipla. Tuttavia, nel corso degli anni gli urologi lo hanno utilizzato con successo nel trattamento della patologia, poiché ha dimostrato di ridurre l'attività della malattia nella risonanza magnetica, oltre al tasso di progressione della disabilità nei pazienti con sclerosi multipla progressiva. Uno **studio** del 2016 ha valutato la sicurezza e l'efficacia del farmaco nella patologia autoimmune: un totale di 822 persone con diversi tipi di sclerosi multipla tra remittente-ricidivante, primariamente progressiva e secondariamente progressiva sono stati trattati con Rituximab; il **7,8%** dei soggetti ha presentato lievi effetti collaterali legati al sito di iniezione e un totale di 72 persone ha riferito effetti collaterali moderati o gravi, dovuti ad infezioni. Lo studio ha quindi dimostrato la sicurezza e l'efficacia del farmaco, il quale, per il fatto di non essere stato approvato come trattamento della sclerosi multipla, rientra tra i farmaci **off-label** che vengono impiegati nella patologia.³⁷

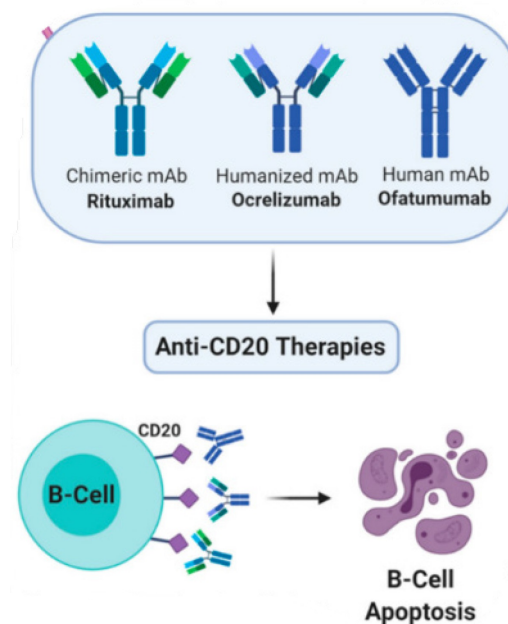


Figura 35: Principio di induzione dell'apoptosi da parte degli anticorpi monoclonali anti-CD20

5.11 Cladribina

La Cladribina è un farmaco chemioterapico e immunosoppressore approvato per la sclerosi multipla a decorso recidivante-remittente con il nome commerciale **Mavenclad**. Strutturalmente si tratta di un analogo della purina e, come tale, ha la capacità di mimare il nucleotide adenosina, andando ad inibire l'enzima **adenosina deaminasi**, il quale interviene nei passaggi di processamento del DNA. Esercita il suo effetto quando viene internalizzata dai linfociti B e T e dopo aver subito fosforilazione; è quindi classificabile come **profarmaco**, in quanto l'azione terapeutica viene svolta da un suo metabolita attivo. Come effetto finale si ha l'induzione dell'apoptosi dei linfociti B e T, motivo per cui uno dei possibili effetti indesiderati riscontrabili è la linfopenia, con possibilità che alcune infezioni inattive possano essere riattivate. Per il trattamento della sclerosi multipla recidivante-remittente, la Cladribina viene somministrata per via orale e segue un regime terapeutico specifico, che ne limita l'uso ad un massimo di 20 dosi nei primi due anni. La Cladribina non è approvata per indicazioni diverse dalla leucemia a cellule capellute e dalla SM, anche se il dosaggio somministrato tra la patologia tumorale e in quella autoimmune è molto diverso. Prima di iniziare il trattamento con Mavenclad è necessario che il paziente esegua una conta linfocitaria, che dovrà essere ripetuta 2 e 6 mesi dopo l'inizio del trattamento in ogni anno.³

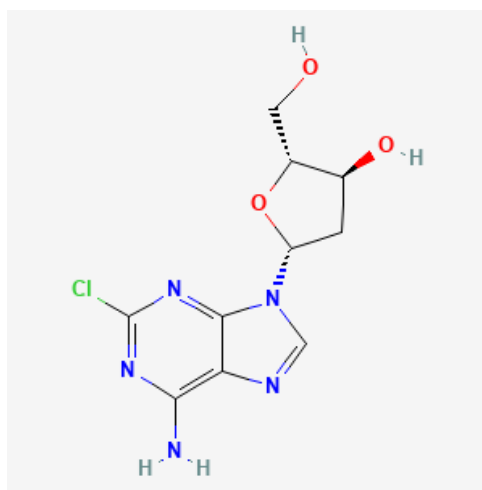


Figura 36: Struttura chimica di Cladribina

5.12 Mitoxantrone

In alcuni casi, per trattare i soggetti affetti da sclerosi multipla, si ricorre anche a farmaci antitumorali. Il Mitoxantrone è un analogo antraciclino che appartiene alla classe degli **intercalanti ed antitopoisomerasi**; infatti, oltre ad essere in grado di intercalarsi nel DNA tra le coppie di basi provocando deformazione della doppia elica e bloccando i processi di duplicazione e trascrizione, possiede anche la capacità di bloccare l'azione delle topoisomerasi,

enzimi chiave nel ridurre lo stress torsionale delle eliche che compongono il DNA. In commercio si trova sotto il nome di **Novantrone** ed è stato approvato per il trattamento della sclerosi multipla secondariamente progressiva e per trattare il peggioramento della disabilità nella forma recidivante-remittente.²⁹ Il Mitoxantrone riduce non solo la secrezione di anticorpi da parte dei linfociti B, ma anche la produzione di citochine. Inoltre, il farmaco si è dimostrato efficace anche nel ridurre la migrazione sia delle cellule linfocitarie che dei monociti. Viene somministrato per via endovenosa in ambiente ospedaliero, ed è importante tenere monitorati i livelli di globuli bianchi nel sangue. L'impiego di Mitoxantrone dovrebbe essere limitato a pazienti che manifestano un peggioramento della RRMS o SPMS con evidenza di un'attività infiammatoria, dopo un'attenta valutazione dei profili di rischio e beneficio dei singoli soggetti. La valutazione dovrebbe considerare anche la disponibilità di terapie alternative con eventi avversi meno gravi.³¹ Infatti, uno degli effetti indesiderati che il farmaco può comportare è la **cardiotossicità**, motivo per cui ad oggi Mitoxantrone non trova praticamente posto negli algoritmi di trattamento della sclerosi multipla.²⁹

5.13 Off-label

Un altro approccio terapeutico farmacologico e che può essere d'aiuto nella sclerosi multipla prevede l'impiego di farmaci off-label. Con questo termine si intendono dei medicinali che non sono approvati ed indicati nel trattamento della sclerosi multipla, ma che possono comunque essere impiegati nella patologia, perché negli anni sono emerse evidenze scientifiche che dimostrano la loro efficacia. Sono dunque farmaci regolarmente in commercio, ma per un'indicazione diversa da quella per cui sono stati autorizzati; ovviamente è il medico che deve effettuare una valutazione della terapia ideale per il paziente e valutare la possibilità di prescrivere farmaci di questo tipo.³³ Nel trattamento della sclerosi multipla gli off-label che vengono maggiormente utilizzati sono la Ciclofosfamide, l'Azatioprina, il Metotrexato e l'anticorpo monoclonale anti-CD20 già menzionato Rituximab.

Ciclofosfamide è un agente alchilante solitamente utilizzato nei linfomi, nelle leucemie, nei mielomi e nei tumori solidi. È commercializzata sotto il nome di **Endoxan** e nella sclerosi multipla viene impiegata per il trattamento delle fasi più attive e cronico-progressive, in quei pazienti che non possono trarre vantaggio dall'utilizzo di altri farmaci.¹⁶ Essendo un **profarmaco**, l'attivazione della Ciclofosfamide richiede un metabolismo epatico, attraverso il quale viene prodotto il derivato fosforamidico, che esercita l'azione farmacologica; le somministrazioni preferibili sono dunque la via orale o quella endovenosa. Oltre alla mostarda fosforamidica attiva, la reazione di biotrasformazione che avviene nel fegato determina anche la formazione dell'**acroleina**, molecola tossica per i reni e la vescica. Ecco perché bisogna sempre

somministrare il farmaco in associazione con Mesna (2-MercaptoEtanSolfonato Na), uroprotettore che riduce gli effetti tossici di terapie con farmaci alchilanti. Il meccanismo d'azione della Ciclofosfamide consiste in una deplezione del DNA che provoca il danneggiamento di cellule linfocitarie, delle quali viene anche ridotta la proliferazione. A causa degli effetti di mielo ed immunosoppressione, la Ciclofosfamide deve essere impiegata con la massima attenzione in soggetti deboli o anziani, come anche nei pazienti che sono stati precedentemente sottoposti a radioterapia.³⁴

Azatioprina è impiegata come terapia di mantenimento nei pazienti che soffrono di sclerosi multipla con frequenti ricadute e necessitano di somministrazione di steroidi. È anch'essa un **profarmaco**, e il derivato attivo ottenuto tramite metabolismo va ad agire alterando la sintesi del DNA, in particolar modo nei confronti delle cellule linfocitarie. In questo modo il farmaco contribuisce a ridurre la progressione della patologia e la frequenza degli attacchi acuti.³⁵ In uno **studio** pubblicato nel 2007 confrontato con placebo, sono stati analizzati i risultati sulla progressione della disabilità e sull'incidenza nelle ricadute da parte del farmaco.³⁶ Il farmaco ha ridotto il numero di pazienti che hanno registrato ricadute durante il primo anno di trattamento. Per quanto riguarda gli effetti collaterali, i disturbi gastrointestinali e la tossicità epatica sono stati riscontrati maggiormente nel gruppo a cui veniva somministrata Azatioprina rispetto al placebo; tuttavia, questi effetti avversi erano previsti, e aggiustando il dosaggio sono stati facilmente gestiti. È importante tenere in considerazione un possibile rischio di tumore nella terapia a lungo termine con Azatioprina: è stato dimostrato che si potrebbe manifestare questo grave effetto indesiderato quando la terapia supera i 10 anni e la dose cumulativa del farmaco i 600 g totali. Nel complesso, comunque, considerando il rapporto rischio-beneficio, Azatioprina risulta essere una valida alternativa all'Interferone-β nel trattamento della sclerosi multipla.³⁶

Metotrexato è un farmaco antitumorale classificato come antimetabolita ed indicato per il trattamento della leucemia acuta. La sua struttura gli conferisce la capacità di inibire la **diidrolotoreduttasi (DHFR)** di mammifero, enzima che catalizza la reazione che porta alla produzione di acido tetraidrofolico, la molecola indispensabile per la sintesi delle basi del DNA. Il farmaco è anche un inibitore indiretto di un altro enzima chiamato **timidilato sintetasi**, che ha la funzione di regolare la sintesi de novo di DNA. L'utilizzo del Metotrexato come trattamento off-label nella sclerosi multipla è limitato ai pazienti giovani ed alle forme della patologia caratterizzate da un rapido aumento della disabilità, in quanto l'aggressività della terapia e la gravità dei possibili effetti collaterali indicano l'uso di questo farmaco solo in casi estremi e nei quali i trattamenti precedenti non hanno funzionato.

6. CHINASI

La regolazione di svariati processi cellulari quali proliferazione, apoptosi, sopravvivenza, metabolismo e differenziazione è mediata da enzimi specifici, le chinasi, le quali possono regolare diverse vie di trasduzione del segnale tramite la **fosforilazione** di numerose molecole. Sono infatti in grado di catalizzare il trasferimento di un gruppo γ -**fosfato** dall'**ATP** ai substrati, i quali diventano attivi e possono esercitare il loro effetto nell'organismo. Alcune sono coinvolte in modo centrale nel metabolismo di carboidrati, lipidi, nucleotidi, residui di amminoacidi, vitamine e cofattori; altre hanno un ruolo in processi come la regolazione genica, la contrazione muscolare e la resistenza agli antibiotici. Nonostante tutte catalizzino essenzialmente la stessa reazione di trasferimento di gruppi fosfato, esse mostrano una notevole diversità nelle loro strutture, nella specificità dei substrati e nel numero di percorsi a cui partecipano.³⁹

Le chinasi rappresentano quindi un insieme unico, dinamico e precisamente regolato di "interruttori" che controllano la maggior parte degli eventi biologici nelle cellule eucariotiche.⁴⁰ La loro funzione non è semplicemente quella di trasformare in modo efficace un prodotto, ma piuttosto di avviare una cascata di eventi. Anche in alcuni processi infiammatori a livello centrale che portano allo sviluppo della sclerosi multipla sono presenti proteine chinasi che giocano un ruolo importante; **la tirosina-chinasi di Bruton** è una di queste, in quanto, tramite la trasduzione del segnale che è in grado di regolare, influenza i processi di crescita, proliferazione e differenziazione di cellule immunitarie come i linfociti B.

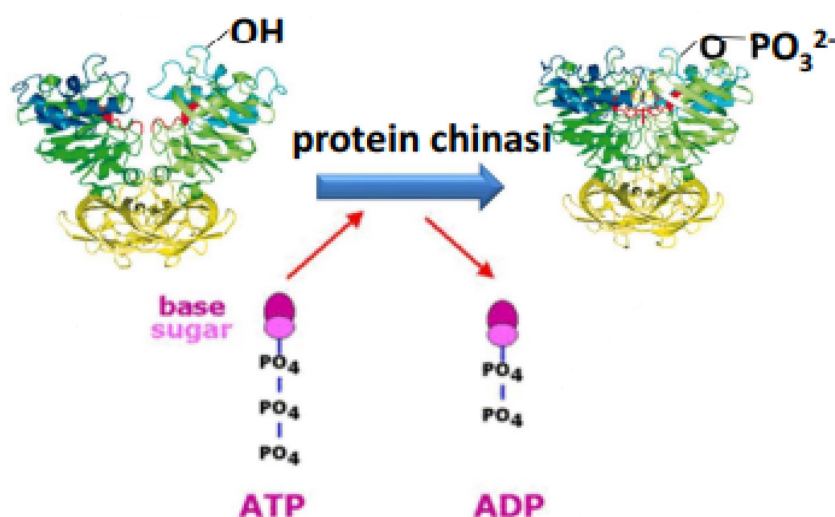


Figura 37: Reazione di fosforilazione catalizzata dalle chinasi

6.1 Classificazione

Una classificazione possibile per distinguere tra loro le chinasi si basa sul tipo di **amminoacido** che sono in grado di fosforilare; infatti, la fosforilazione da parte di queste proteine avviene a livello di un gruppo ossidrilico del substrato. Si parlerà di **serin-treoninchinasi (STK)** se l'operazione di aggiunta del gruppo fosfato avviene sull'OH alifatico di **Serina** o **Treonina**, o di **tirosinchinasi (TK)** quando l'OH fosforilato è quello dell'amminoacido aromatico **Tirosina**. Un'ulteriore suddivisione delle tirosinchinasi le distingue in **recettoriali (RTK)** e **non recettoriali (NRTK)**: le prime, note anche come recettori per i fattori di crescita, sono proteine trans-membrana con duplice attività, sia recettoriale, poiché presentano un dominio extracellulare che lega i fattori di crescita, che enzimatica, in quanto il dominio è intracellulare e ha attività catalitica con i siti di legame per l'ATP e il substrato; le TK non recettoriali presentano invece solo il dominio catalitico con il sito specifico per il legame dell'ATP.

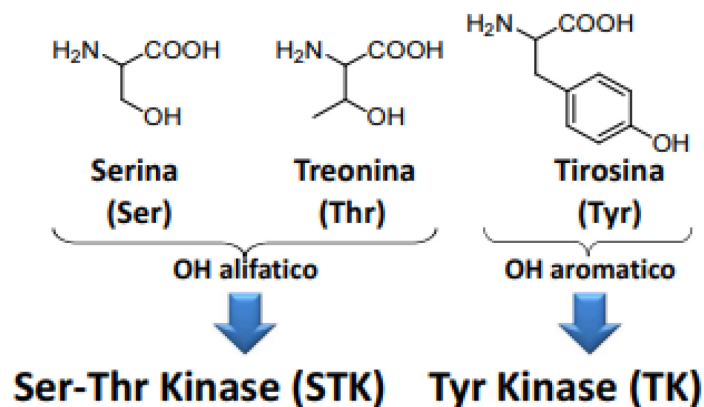


Figura 38: Classificazione delle chinasi in base all'amminoacido che fosforilano

6.2 Struttura

In base alla conformazione e all'orientamento nello spazio che assumono, le chinasi possono passare da uno stato inattivo ad uno stato attivo; la struttura che le caratterizza è quindi un aspetto fondamentale, poiché può determinare in maniera diretta la loro attività.

Tutte le protein-chinasi possiedono alcuni elementi conservati in comune, i quali sono sempre presenti e costituiscono la componente essenziale di ogni enzima. Esistono poi dei motivi, come ad esempio il residuo "gatekeeper", che non sono conservati e cambiano da proteina a proteina.

Come si può notare dalla *figura 39*, generalmente le chinasi sono costituite da due porzioni o lobi che suddividono a metà la struttura e contribuiscono sia alla catalisi che alla regolazione; essi prendono il nome di lobo **N-terminale** e lobo **C-terminale**.

Il primo comprende **cinque foglietti β** ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$) accoppiati ad una **α -elica C**.

Tra le strutture a foglietto $\beta 1$ e $\beta 2$ rappresentate in verde si trova una sequenza altamente conservate nelle chinasi: il “**glycine rich loop**”. Questo motivo ricco di glicine è la parte più flessibile della porzione N-terminale e ha la capacità di posizionare correttamente il gruppo γ -fosfato dell’ATP per favorire la reazione di fosforilazione.⁴⁰

Come illustrato nella *figura 39 B)*, l’anello adeninico dell’adenosina trifosfato viene posizionato tra i due foglietti β ed interagisce con le glicine conservate rappresentate dalle sfere rosse. Il loop ricco di glicine è seguito anche dall’amminoacido **valina**, anch’esso altamente conservato, che stabilisce un legame idrofobico con la base dell’ATP.⁴⁰

L’ **α -elica C** della porzione N-terminale rappresenta un elemento regolatore molto dinamico nelle chinasi e occupa una posizione strategica tra i due lobi. È in grado di collegarsi a diverse parti della molecola, influenzando la trasduzione del segnale operata dalla chinasi. Il loop tra l’estremità C-terminale dell’elica e il foglietto permette il legame dell’elica stessa al lobo C della chinasi; l’estremità N-terminale dell’elica è invece collegata al **segmento di attivazione** della chinasi. Questa interazione è di fondamentale importanza, in quanto il posizionamento dell’estremità N-terminale dell’elica C e la distanza che intercorre tra essa ed il loop di attivazione è uno dei passaggi critici da raggiungere per ottenere una conformazione idonea che permetta un’efficiente attività catalitica della proteina-chinasi.

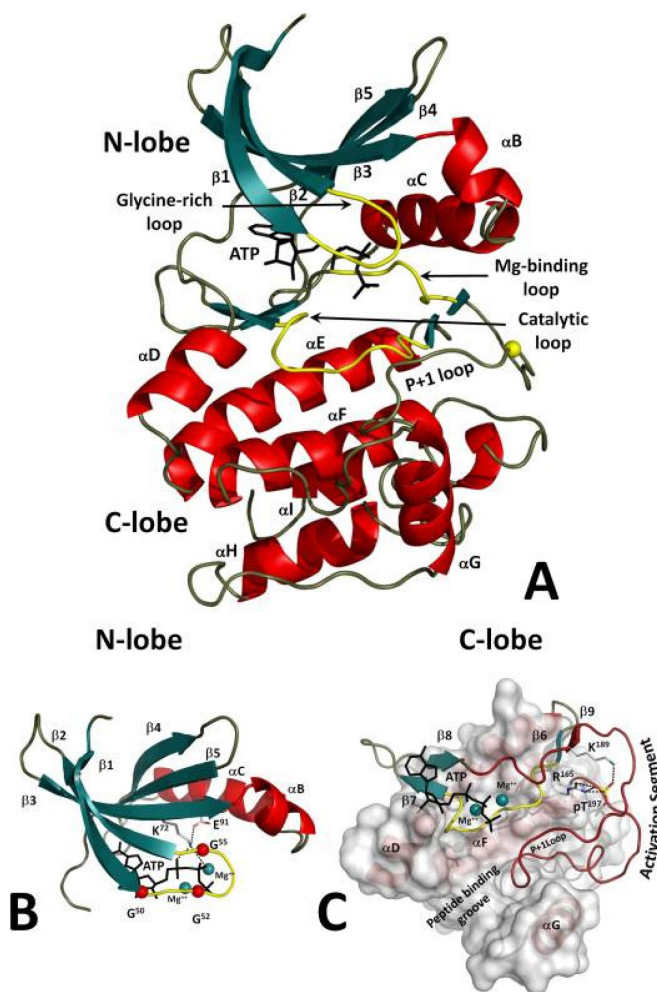


Figura 39: A) Struttura generale di una chinasi; B) Struttura del lobo N-terminale; C) Struttura del lobo C-terminale

Un altro importante motivo di trova nel foglietto $\beta 3$ e prende il nome di **AxK**. La **lisina** contenuta in questo motivo, oltre ad accoppiare i fosfati dell'ATP all'elica C, ha la capacità di formare un **ponte salino** con l'**acido glutammico** presente nell'elica; il ponte è un segno distintivo dello stato attivo, e rappresenta un elemento altamente conservato nella famiglia delle protein-chinasi. Quando l'enzima si trova nello stato attivo e l'elica C è legata al core di foglietti β , la porzione N-terminale della chinasi si muove come un corpo rigido in grado di aprirsi e chiudersi.

La seconda porzione strutturale delle protein-chinasi, come illustrato dalle *figure 39 ed 39 C*), è rappresentata dal lobo **C-terminale**. È costituito da un **sistema elicoidale**, importante per legare i substrati da fosforilare, e un **sottodominio strutturale β** che comprende i filamenti da $\beta 6$ a $\beta 9$, con funzione centrale nel trasferimento del gruppo fosfato dall'ATP al substrato proteico.⁴⁰

Tra le α eliche che costituiscono la porzione C-terminale delle chinasi, svolge un ruolo fondamentale l'**elica idrofobica F**, in quanto funge da "impalcatura" centrale per l'assemblaggio dell'intera molecola e per l'attività catalitica. La *figura 40* evidenzia come l'elica F sia ancorata ad altre due strutture idrofobiche, rappresentate con i colori giallo e rosso; quest'ultime possono essere definite come "**spine dorsali**" (**R e C**) della chinasi, le quali sono agganciate direttamente all'elica F e, attraversando l'intera molecola dell'enzima, fungono anche da collegamento tra il lobo N-terminale e quello C-terminale. L'elica F rappresenta quindi un elemento centrale in grado di coordinare le due spine con il resto della molecola. La **spina C** è collegata direttamente all'estremità C-terminale della elica F, mentre l'estremità N-terminale funge da punto d'attacco per la **spina R**.⁴⁰

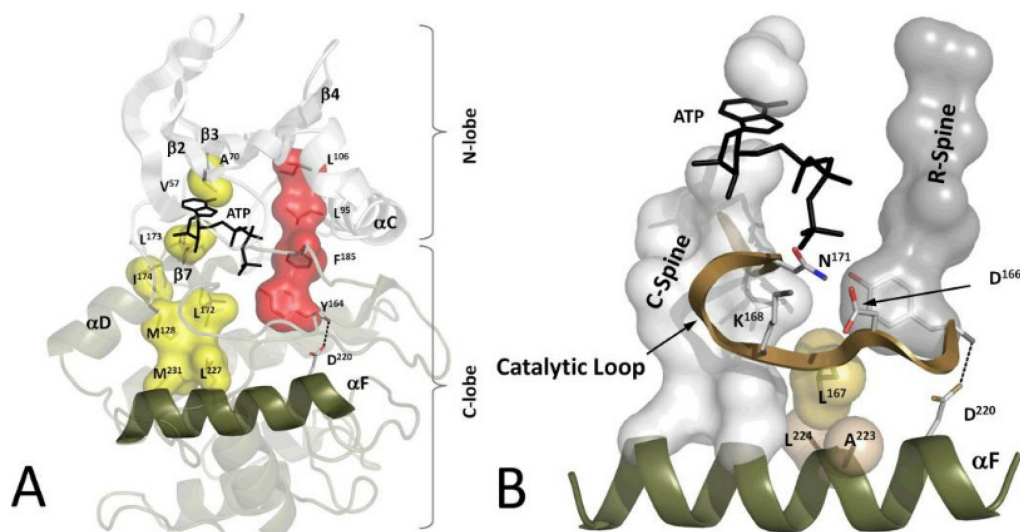


Figura 40: Illustrazione delle due spine C e R (rispettivamente in giallo e rosso) e la α -elica F (in verde)

Tra le due spine R e C è posizionato il “**residuo gatekeeper**”, un amminoacido che forma parte della tasca idrofobica di legame con l’ATP e che svolge un ruolo importante nell’attivazione delle chinasi, oltre che nel mantenimento della stessa. I residui gatekeeper hanno infatti la funzione di stabilizzare la spina R, che partecipa alla conservazione dello stato attivo; oltre a questo, hanno anche la capacità di influenzare l’affinità degli inibitori di chinasi, peculiarità che può essere sfruttata per sintetizzare molecole dirette verso specifiche protein-chinasi.

La caratteristica degli amminoacidi gatekeeper che influenza capacità di stabilizzare la spina R è la loro **dimensione**: le chinasi aventi amminoacidi piccoli nella struttura, come ad esempio la **valina** o la **treonina**, non sono efficaci stabilizzatori della spina R, in quanto quest’ultima, al momento della dell’inattivazione, si disgrega facilmente. Al contrario, nel caso di amminoacidi di grandi dimensioni come la **leucina** o la **metionina**, viene favorita maggiormente la stabilizzazione della spina R, mantenendo la conformazione attiva.

Uno dei problemi correlati a questo aspetto riguarda i meccanismi di **resistenza** ai farmaci inibitori; l’esempio riportato nella *figura 41* spiega come un inibitore di chinasi come Imatinib (**Gleevec**) si lega solitamente alle conformazioni inattive, ma le sostituzioni amminoacidiche a livello del residuo gatekeeper possono provocare resistenza al farmaco. Nelle figure **b** e **c** si può notare come cambi il legame all’inibitore a seconda dell’amminoacido presente: con la **treonina** la stabilizzazione è sfavorita ed Imatinib riesce a legarsi opportunamente ed esercitare i suoi effetti farmacologici, mentre nel caso della **metionina** il farmaco non riesce a legarsi adeguatamente, favorendo l’attività della chinasi, che può agire liberamente. ⁴⁰

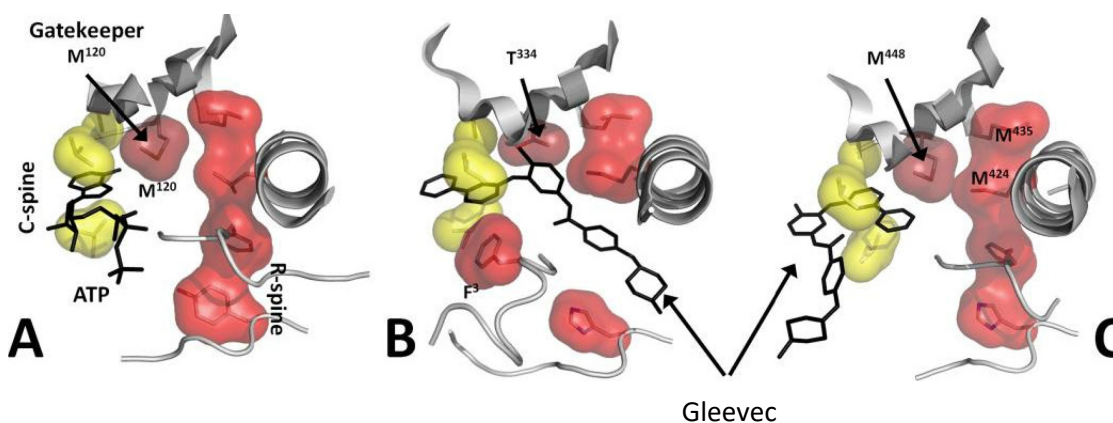


Figura 41: A) Posizionamento dell’amminoacido gatekeeper nella struttura di una chinasi; B) Presenza di una treonina come residuo gatekeeper: Gleevec può agire liberamente; C) Presenza di una metionina come residuo gatekeeper: Gleevec non riesce a legarsi adeguatamente

6.3 Attivazione protein-chinasi

Nelle fasi di attivazione e disattivazione delle chinasi, occupa un ruolo centrale il **segmento di attivazione**, che si estende dal motivo DFG all'elica F idrofobica. La lunghezza e la sequenza di questo segmento sono le parti più variabili del core delle chinasi, e consentono una regolazione dinamica dell'attività di questi enzimi.

Tutti i residui amminoacidici che fanno parte del segmento di attivazione svolgono un ruolo critico nel controllare l'attività catalitica della chinasi (figura 42). Tra i foglietti $\beta 8$ e $\beta 9$ si trova il **motivo DFG** (Asp-Phe-Gly), loop flessibile fondamentale per riconoscere uno degli ioni di **Magnesio** legati all'ATP e nella determinazione della conformazione attiva o non attiva della chinasi.⁴⁰

La parte più varia del segmento è il **loop di attivazione**, il quale contiene una **treonina** che funge da sito di fosforilazione primario.

Il seguente motivo chiamato "**P+1 loop**" ha la funzione di formare una

tasca che accoglie i residui del substrato peptidico che si trovano subito dopo l'amminoacido da fosforilare (serina, treonina o tirosina), favorendo così la stabilizzazione.

Il **motivo APE** altamente conservato stabilizza ulteriormente il segmento di attivazione agganciandolo all'elica F.

Per favorire la completa attivazione della chinasi il **loop catalitico** (color sabbia nell'immagine) immobilizza un gruppo fosfato tramite l'**arginina R165**, oltre a formare legami multipli che coinvolgono il loop di attivazione e l' α -elica C del lobo N-terminale della chinasi, stabilizzando la configurazione attiva del segmento che viene conservata in tutte le proteine chinasi.

Il corretto posizionamento della elica C e del motivo DFG tramite la **fenilalanina** è di fondamentale importanza per l'assemblaggio della spina R, la quale necessita di essere integra per permettere una efficiente attività catalitica.

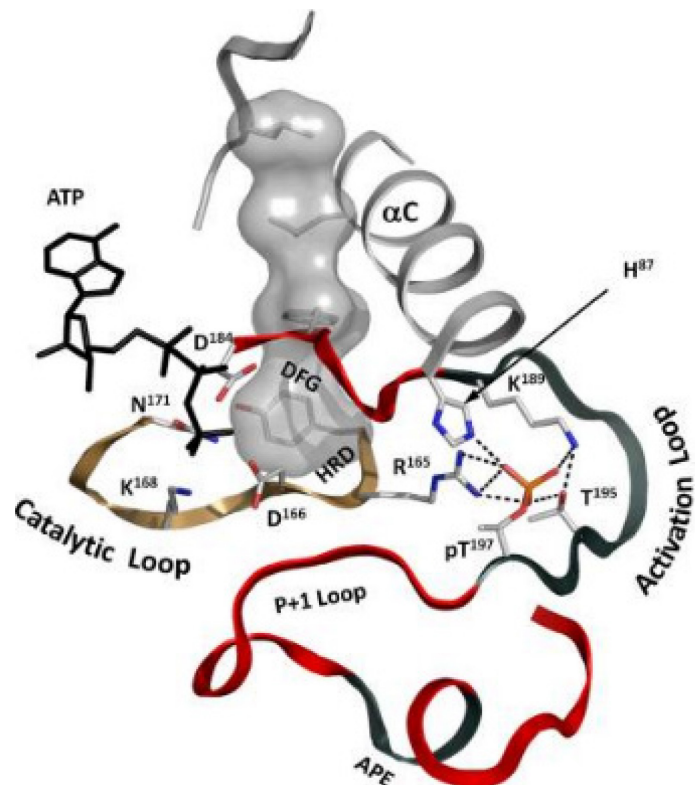


Figura 42: Illustrazione dei motivi amminoacidici del segmento di attivazione cruciali per l'attività delle chinasi

La conformazione attiva delle chinasi viene relativamente conservata, anche se possono esserci differenze dovute alla lunghezza e alla sequenza del segmento di attivazione che si dispone all'interno della struttura. Ciò che invece comprende una grande varietà di conformazioni è lo **stato inattivo**, che può variare in modo significativo tra le diverse chinasi. In ogni caso, la caratteristica che le accomuna in fase di inattivazione prevede il **disassemblaggio della spina regolatoria R**, la quale deve necessariamente rompersi per favorire lo stato inattivo. Il meccanismo più comune che permette il cambio conformazionale coinvolge motivo DFG, il quale ha la capacità di regolare l'attività della molecola assumendo due possibili strutture nello spazio: la disposizione "**DFG out**" prevede che il motivo si ponga di fronte all'entrata della tasca di legame, bloccando l'ingresso di ATP e substrato; al contrario, quando il motivo si trova nella configurazione "**DFG in**", non crea ingombro sterico e, direzionandosi verso l'interno del sito di legame, lascia libero il passaggio, favorendo lo stato attivo della chinasi.

7. TEC FAMILY

Durante l'ultimo decennio, la percezione dell'importanza dei **linfociti B** nella sclerosi multipla è cambiata considerevolmente; ad oggi è assodato che queste cellule immunitarie giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo della malattia: la loro abilità di riconoscere un antigene attraverso il recettore **BCR**, internalizzarlo e processarlo tramite il complesso maggiore di istocompatibilità di classe II, per infine di presentarlo ai linfociti T, costituisce uno degli eventi chiave nell'alterazione della risposta immunitaria.⁴¹ Le cellule B giocano quindi un ruolo centrale nella patogenesi della sclerosi multipla (SM), come dimostrato dal successo di vari anticorpi monoclonali che, eliminando questi linfociti, hanno determinato un miglioramento del quadro patologico.⁴²

La **tirosina-chinasi di Bruton (BTK)** è una molecola critica nella segnalazione intracellulare del recettore BCR dei linfociti B, motivo per il quale negli ultimi anni la ricerca ha iniziato a considerare la sua inibizione come approccio interessante per il trattamento di un'ampia varietà di malattie autoimmuni, tra le quali anche la sclerosi multipla.⁴²

La scoperta dell'importanza dell'attività di BTK per lo sviluppo e la differenziazione dei linfociti B è dovuta ad alcuni studi effettuati **sull'agammaglobulinemia (XLA)** negli umani e **sull'immunodeficienza legata al cromosoma X (Xid)** nei topi. È stato visto come una bassa attività della chinasi di Bruton abbia portato allo sviluppo delle due patologie, con i pazienti malati di XLA che hanno registrato un decremento del numero di linfociti B maturi, seguito da una riduzione dei livelli di immunoglobuline circolanti.⁴

7.1 BTK come chinasi Tec

BTK è uno dei membri di **Tec**, famiglia di protein chinasi **non recettoriali** avente un ruolo fondamentale nei meccanismi di signaling cellulare; in particolare, sono coinvolte nei meccanismi di trasduzione del segnale che vedono implicati recettori per le citochine, antigeni di superficie dei linfociti e proteine transmembrana. Tramite le fosforilazioni che sono in grado di compiere, queste proteine giocano un ruolo importante nei processi di crescita e differenziazione delle cellule ematiche, tra cui quelle immunitarie.⁴³

Gli altri 4 membri che assieme a BTK completano la famiglia Tec sono: "tyrosine kinase espresse in hepatocellular carcinoma" **TEC**, "interleukin-2-inducibile T cell kinase" **ITK**, "resting lymphocyte kinase" **RLK** e "bone marrow expressed kinase" **BMX**.⁴⁴

La maggior parte delle cellule del sistema immunitario esprime almeno uno dei membri della Tec family;⁴⁵ TEC e BMX sono chinasi ubiquitarie, si trovano sia in tessuti ematopoietici sia in organi non responsabili della produzione di elementi cellulari del sangue. ITK, RLK e BTK sono invece

più selettive: le prime due sono espresse nei linfociti T, mentre la tirosin chinasi di Bruton si trova soprattutto a livello dei linfociti B e delle cellule mieloidi.⁴³

Dal punto di vista strutturale le chinasi della famiglia Tec sono simili tra loro, e presentano domini in comune lungo tutta la sequenza amminoacidica. A livello dell'estremità N-terminale possiedono un dominio "pleckstrin homology" PH (tutte escluse RLK, che invece presenta un motivo di cisteine) e un dominio "Tec homology" TH; quest'ultimo è formato da una **regione ricca di prolina (PRR)** in combinazione con un "BTK motif" che, assieme al dominio PH, costituiscono il sito di legame per alcuni tipi di proteine G, le quali possono direttamente legare le chinasi e regolarne le loro attività.^{44,43} Nella regione C-terminale troviamo invece i due domini Src SH2 e SH3, assieme al **dominio catalitico** della chinasi; tutti partecipano al processo di fosforilazione dei residui di tirosina presenti nei substrati degli enzimi.⁴³

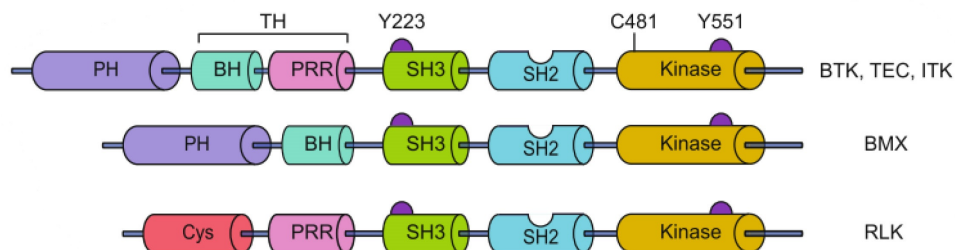


Figura 43: differenze nei domini strutturali tra le chinasi della famiglia Tec

7.2 Attivazione famiglia Tec

La stimolazione e conseguente attivazione delle chinasi Tec è determinata dalla possibile esposizione a svariati antigeni. Riguardo al sistema immunitario, l'esposizione a proteine come **CD3**, **CD28** o **CD72**, presenti sulla superficie delle cellule difensive, provoca la cascata di eventi che porta all'attivazione completa.

La stimolazione di BCR (recettore dei linfociti B) o TCR (recettore dei linfociti T) determina una rapida attivazione delle chinasi della famiglia **Src**, che fosforilano componenti del recettore provocando il reclutamento del secondo messaggero **PI3-K (fosfatidilinositolo-3-chinasi)**. L'enzima si attiva e produce **fosfatidilinositolo-trifosfato (PIP3)**, molecola in grado di attirare le chinasi Tec in prossimità della membrana cellulare tramite interazione con il loro dominio PH. L'attivazione viene completata con un ulteriore intervento da parte di Src che fosforila le Tec a livello del **residuo tirosinico**.⁴³

L'attivazione delle chinasi Tec porta alla successiva regolazione delle vie di trasduzione del segnale nelle quali sono coinvolte, con conseguenti effetti sui processi cellulari.

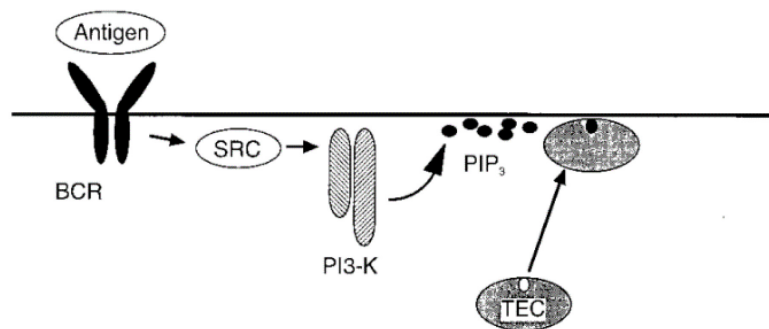


Figura 44: Eventi in successione che portano all'attivazione della famiglia di chinasi Tec

7.3 Struttura famiglia Tec

Dominio PH

La sua presenza è caratteristica delle chinasi della famiglia Tec, poiché nessun'altra protein-chinasi conosciuta presenta questo dominio; l'unico membro che non lo esprime è **RLK**, che al suo posto presenta una sequenza di **cisteine** nell'estremità N-terminale. È un dominio di circa 120 aminoacidi presente in un'ampia gamma di proteine coinvolte nei processi di signaling cellulare.

PH funziona da sito di attacco per certi tipi di **fosfolipidi** e gioca quindi un ruolo importante nel reclutamento delle Tec alla membrana cellulare. In particolare, è stato dimostrato che le cellule possono regolare l'attività di queste chinasi tramite il controllo della **fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K)**, un enzima coinvolto nella trasduzione del segnale tramite la fosforilazione dell'**idrossile** presente sul **fosfatidilinositolo**. È stato dimostrato che il fosfolipide per il quale il dominio PH ha un'affinità maggiore è il **fosfatidilinositolo-trifosfato (PIP₃)**⁴⁶, il quale, attraverso il legame con il dominio di BTK, riesce a reclutare la chinasi a livello della membrana cellulare. La capacità del dominio PH di reclutare le Tec a livello della membrana cellulare è quindi dipendente dall'attività della PI3K.⁴³

Oltre ai fosfolipidi, è stato dimostrato che anche alcune proteine hanno la capacità di interagire con il dominio PH delle chinasi della famiglia Tec. La **subunità α** delle proteine G eterotrimeriche lega direttamente BTK, mentre quella **β** è capace di attivare anche ITK. Anche alcune isoforme della **protein-chinasi C (PKC)** interagiscono con il dominio delle Tec; **PKC- β 1** può fosforilare BTK e inibire così l'attività di quest'ultima⁴⁷

Dominio TH

È un dominio proteico che accomuna tutti i membri della famiglia Tec; è costituito da una **regione ricca di proline** e un **BTK motif**, il quale si compone di 27 aminoacidi e, come nel caso del dominio PH, non è presente all'interno della struttura della chinasi **RLK**. Assieme alla sequenza pleckstrin homology delle chinasi, il dominio TH costituisce un sito di attacco per le **proteine G eterotrimeriche**.

Un'altra caratteristica di TH è quella di poter legare domini **SH3** tramite la regione ricca di proline; ciò può avvenire sia attraverso la sequenza SH3 intrinseca della chinasi Tec, che permette la regolazione negativa dell'attività della proteina, sia legando il dominio SH3 delle protein chinasi appartenenti alla famiglia **Src**: queste possono instaurare un'interazione con le proteine Tec e provocarne l'attivazione.⁴³

Dominio SH3

È un dominio formato da circa 60 residui amminoacidici, responsabili della **regolazione negativa** delle chinasi Tec: legandosi al dominio **TH** della stessa proteina, la mantengono in uno stato inattivo. Questa interazione intramolecolare assume quindi un ruolo fondamentale nella soppressione dell'attività delle chinasi. A livello strutturale SH3 ha un caratteristico ripiegamento a **beta-barrel** che consiste in cinque o sei **filamenti β** disposti come due foglietti β antiparalleli strettamente impacchettati. Le regioni di collegamento tra i foglietti possono contenere brevi eliche.⁴³

A seguito dell'esposizione di un antigene al recettore delle cellule immunitarie, le chinasi della famiglia Tec vengono reclutate a livello della membrana plasmatica. Qui, dopo **fosforilazione** indotta dalle chinasi della famiglia Src, si attivano completamente e mediano la trasduzione del segnale. Come accennato in precedenza, il dominio SH3 ha la peculiarità di poter interagire con la regione ricca di proline del dominio TH; questo tipo di interazione può essere sia intramolecolare, quindi verificarsi all'interno della struttura della stessa proteina, sia intermolecolare, favorendo il legame tra due differenti proteine.

Nel caso specifico di **BTK**, per raggiungere l'attivazione completa della chinasi, sono necessari più passaggi che coinvolgono il dominio SH3 intra ed intermolecolare:

- Src fosforila il residuo tirosinico **Tyr-551** e sposta lo stato di BTK da "inattivo" a "parzialmente attivo"
- La chinasi opera un'**autofosforilazione** del residuo tirosinico **Tyr-223** all'interno del proprio dominio SH3. Questo è un evento chiave per il passaggio da stato parzialmente attivo a quello di completa attività della proteina

- BTK **completamente attiva** può regolare i passaggi di trasduzione del segnale in cui è coinvolta

Come illustrato nella figura, fisiologicamente BTK è mantenuta in uno stato inattivo attraverso il legame tra i residui TH ed SH3. Nel momento in cui Src agisce fosforilando il residuo tirosinico di BTK Tyr-551, la chinasi si attiva parzialmente. Per ottenere la completa attivazione di BTK è necessaria un'autofosforilazione che la chinasi opera sul residuo tirosinico Tyr-223 del proprio dominio SH3: l'aggiunta di un ulteriore gruppo fosfato provoca una modificazione conformazionale nella struttura della proteina, che in questo modo viene totalmente attivata. Il cambiamento sterico favorisce anche una migliore interazione tra il dominio PH della chinasi e i fosfoinositoli durante il processo di reclutamento di BTK dal citosol alla membrana plasmatica.

43

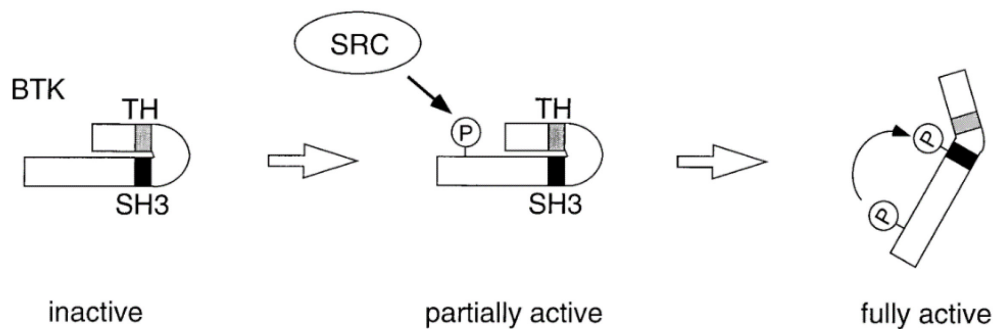


Figura 45: Passaggi in successione che portano all'attivazione completa di BTK

Dominio SH2

È posizionato in prossimità del **dominio catalitico**, a livello dell'estremità C-terminale. È composto da una sequenza di circa 100 aminoacidi e la sua funzione è quella di permettere, alle proteine che lo contengono, di agganciarsi ai residui di tirosina fosforilati di altre proteine.⁴⁸ Infatti, nel processo che porta alla trasduzione del segnale, le tirosin-chinasi agiscono come interruttori attraverso la fosforilazione di tirosine del substrato; il dominio SH2 opera a questo livello, permettendo alle proteine di essere reclutate nella zona fosforilata e attivare un legame con essa a livello della membrana cellulare.⁴⁹ Questo processo costituisce l'evento fondamentale della trasduzione attraverso una membrana, in cui un segnale nel compartimento extracellulare viene "percepito" da un recettore e rielaborato nello spazio intracellulare in una forma chimica diversa, come una tirosina fosforilata, che dà inizio a una serie di eventi alla base della trasduzione del segnale.

La fosforilazione può essere anche direttamente compiuta dal dominio SH2, che funge da attivatore di alcune proteine come **BRDG1**, presente nelle cellule mieloidi e nei linfociti B, e **Dok-1**, la quale però ha bisogno anche dell'intervento di PH e del dominio catalitico per attivarsi completamente. Anche la **fosfolipasi C- γ (PLC- γ)** può legare il dominio SH2: nei linfociti B di pollo è stato visto come essa necessita di BTK per la sua fosforilazione e successiva attivazione.

43

8. BTK

I processi di attivazione, maturazione e differenziazione dei linfociti B passano attraverso la fosforilazione di BTK; di conseguenza, l'inibizione di questa chinasi porta a limitare l'attivazione delle cellule B e ridurre la loro capacità di funzionare come APCs per i linfociti T, processo che nella sclerosi multipla avviene a livello degli oligodendrociti all'interno del SNC e contribuisce al danno della mielina. Il risultato dell'inibizione di BTK è quindi un'attenuazione dell'effetto pro-infiammatorio mediato dai linfociti T, che nella sclerosi multipla prende piede in maniera spropositata ed incontrollata.⁵⁰ È stato osservato che in assenza di BTK i linfociti B registrano un alto livello di apoptosi, poiché il recettore BCR, del quale la chinasi regola la trascrizione, ha la capacità di indurre l'azione della proteina anti apoptotica **Bcl-xL**.⁴⁴ Se viene impedito l'operato di questa molecola, non diventa più possibile regolare i processi del ciclo cellulare, e le cellule vanno incontro ad apoptosi.

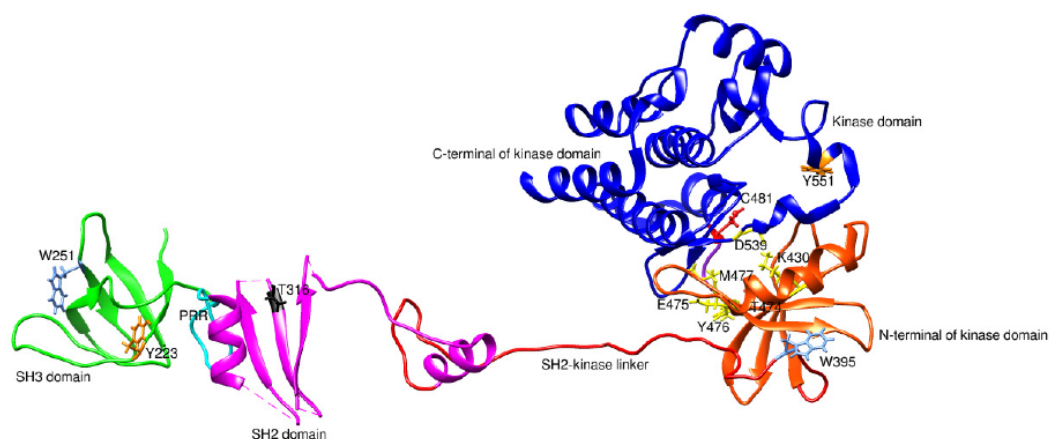


Figura 46: Struttura tridimensionale di BTK

8.1 Storia

La **agammaglobulinemia (XLA)** è una condizione patologica che l'immunologo **Ogden Bruton** analizzò e descrisse nel 1952. La ridottissima presenza di linfociti B nel torrente circolatorio e la conseguente minima produzione di anticorpi sono le caratteristiche principali di questa malattia da immunodeficienza.⁴⁴ Nel 1993 si scoprì che l'insorgere della patologia è dovuto alla mutazione di un gene situato sul cromosoma X che codifica per una proteina chinasi, alla quale fu dato il nome di **Bruton's Tyrosine Kinase**, in onore del pediatra Bruton. Fu quindi appurato che BTK gioca un ruolo cruciale nella maturazione, nella crescita e nella sopravvivenza dei linfociti B, e si cominciò ad analizzare nel dettaglio gli eventi di trasduzione del segnale a cui è correlata.⁴²

8.2 Struttura

Lungo tutta la sequenza di **659 amminoacidi** che compongono BTK troviamo i 5 domini proteici caratteristici delle chinasi Tec. Dall'estremità N-terminale a quella C-terminale sono posizionati rispettivamente i domini **PH** e **TH**, i due domini Src **SH2** e **SH3** e infine il **dominio chinasi** con attività catalitica.⁴²

Come già precedentemente descritto, ogni dominio della chinasi interagisce con differenti proteine coinvolte nella cascata del segnale:

- **PH** presenta un sito di legame per i fosfolipidi che permette a BTK di transitare dal citosol alla membrana cellulare
- **TH** favorisce la stabilizzazione di BTK tramite il legame con alcune proteine G eterotrimeriche e l'interazione con i domini SH3
- **SH2** e **SH3** sono coinvolti in interazioni proteina-proteina
- il **dominio chinasi** all'estremità C-terminale ha attività catalitica

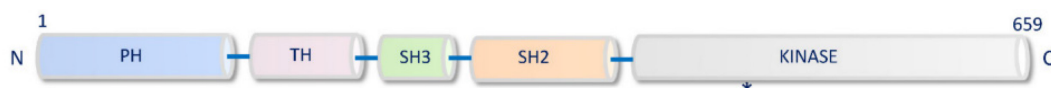


Figura 47: Domini schematizzati che compongono BTK

8.3 Espressione di BTK

Oltre al suo ruolo centrale nella regolazione delle funzioni dei linfociti B, BTK è espressa anche a livello di altri tipi di cellule ematopoietiche, nelle quali esegue compiti altrettanto importanti. È presente a livello di **macrofagi**, **eritroblasti**, **reticolociti** ed **eritrociti**, ma anche nei **monociti**, **granulociti**, **mastociti**, **cellule dendritiche**, **osteoclasti** e **cellule della microglia**. I linfociti T sono esclusi dai leucociti che la esprimono, anche se sono indirettamente influenzati dalla sua attività, e, ovviamente, anche dall'azione delle molecole in grado di inibirla.⁵¹ BTK è pressoché assente nelle cellule natural killer, anche se quest'ultime hanno bisogno dell'intervento della chinasi per poter essere azionate.⁴²

Tramite l'attivazione delle cellule in cui è presente, BTK regola la produzione ed il rilascio di citochine e altri mediatori dell'infiammazione attraverso vari percorsi di signaling cellulare.⁵¹

I **macrofagi** sono cellule fagocitarie che hanno la capacità di presentare l'antigene ai linfociti T; possono inoltre secernere citochine e favorire così il processo infiammatorio. L'attività fagocitaria e il rilascio di citochine proinfiammatorie sono mediati da recettori come **FcγR** e **TLR4**, la cui trasduzione del segnale coinvolge la tirosina chinasi di Bruton.⁴²

BTK è coinvolta anche nell'attivazione e nella differenziazione delle **cellule dendritiche**. Quest'ultime, allo stesso modo dei macrofagi, dei linfociti B e delle cellule della microglia, possono fungere da APCs per i linfociti T. ⁴²

I **mastociti** fanno parte del sistema immunitario innato ed esprimono BTK ad elevati livelli; risiedono nelle meningi e hanno un ruolo nella patogenesi della sclerosi multipla. ⁴²

Le cellule della **microglia** sono classificabili come macrofagi residenti nel SNC, e costituiscono una parte fondamentale del sistema immunitario innato. ⁴² Anch'esse esprimono BTK, e la loro attivazione comporta una maggiore produzione di citochine proinfiammatorie, oltre che di specie reattive dell'ossigeno (**ROS**) e dell'azoto (**RNS**), le quali contribuiscono alla degenerazione cronica di neuroni, assoni ed oligodendrociti.

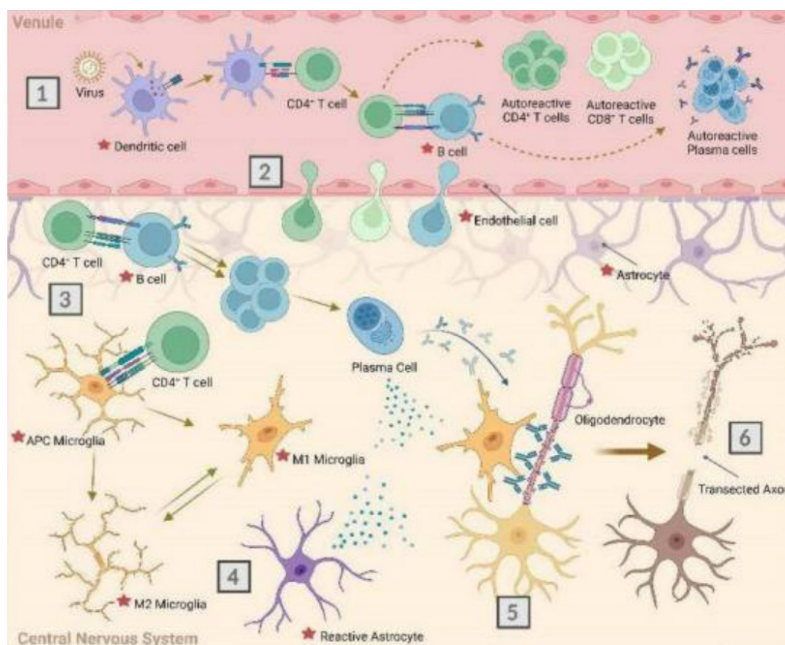


Figura 48: Rappresentazione delle cellule che prendono parte al processo infiammatorio della sclerosi multipla (quelle che esprimono BTK sono marcate con una stella rossa)

8.4 B Cell Receptor

Il reclutamento e la successiva attivazione di BTK sono permessi a seguito dell'esposizione di un antigene al **recettore BCR**, presente sulla membrana dei linfociti B. Il riconoscimento specifico comporta l'innescamento della cascata del segnale che, tramite l'azione della chinasi, modula le funzioni vitali di queste cellule immunitarie.

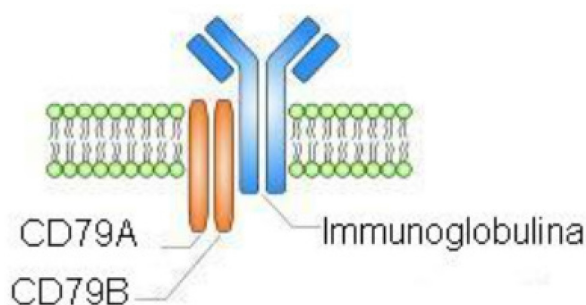


Figura 49: Componenti stilizzate che formano il recettore BCR

Nel momento in cui un antigene viene riconosciuto da un recettore, i linfociti B si moltiplicano per poi specializzarsi in **plasmacellule** o **cellule della memoria**. Le prime hanno la funzione di produrre anticorpi, molecole che non sono in grado di distruggere direttamente gli organismi estranei, ma che esercitano la loro influenza protettiva bloccando fisicamente gli antigeni o amplificando le risposte immunitarie innate reclutando altre cellule. Le **cellule della memoria**, invece, non partecipano in maniera attiva all'intervento difensivo nei confronti dell'elemento estraneo che ha invaso l'organismo, piuttosto hanno il compito di "immagazzinare" le caratteristiche dell'antigene e, nel caso di una nuova esposizione allo stesso, permettere un più rapido e facile intervento difensivo.

Dal punto di vista strutturale il recettore BCR è formato da due parti:

- **Anticorpo** o immunoglobulina: molecola a forma di Y che ha la capacità di legare l'antigene specifico attraverso i frammenti variabili Fab, che si trovano nelle estremità dei due bracci della molecola; Fc è invece la parte costante dell'anticorpo ed è identica per ogni sottoclasse di immunoglobuline
- Eterodimero **Ig- α /Ig- β (CD79a/CD79b)**: sono proteine transmembrana unite tra loro da ponti disolfuro; possiedono una coda citoplasmatica che presenta una sequenza **ITAM**, motivo di amminoacidi che, dopo esposizione dell'antigene a BCR, dà il via alla trasduzione del segnale dopo essere stato fosforilato dalle protein chinasi Src. Questo evento di iniziazione è fondamentale anche per ottenere la successiva attivazione di BTK e la regolazione dei pathway di segnalazione cellulare nei quali è coinvolta.

8.5 Reclutamento e attivazione di BTK

La trasduzione del segnale innescata dalla presentazione di un antigene al recettore BCR dei linfociti B non coinvolge solo la tirosina chinasi di Bruton; i pathways cellulari che si attivano successivamente all'esposizione interessano anche altri tipi di chinasi. Sono infatti 4 le famiglie

di tirosin-chinasi non recettoriali che prendono parte ai meccanismi di signaling mediati da BCR.

⁴⁴ Le vie di trasduzione del segnale che si susseguono portano all'espressione di **fattori di trascrizione** che giocano un ruolo fondamentale nei processi di sviluppo, sopravvivenza e differenziazione dei linfociti B. ⁴²

Per innescare la trasduzione del segnale che coinvolge la tirosina-chinasi di Bruton deve innanzitutto verificarsi il legame tra recettore BCR ed **antigene** riconosciuto. La componente immunoglobulinica di **BCR** si associa al complesso di proteine transmembrana **Ig- α /Ig β** (CD79a/CD79b); quest'ultimo contiene i motivi di attivazione che prendono il nome di **ITAM (immunoreceptor tyrosine based activation motifs)**, richiesti per avviare la trasduzione del segnale. La fosforilazione di questi motivi da parte delle chinasi appartenenti alla famiglia Src (in particolare **SYK** e **LYN**) costituisce il primo passaggio che apre la strada ai successivi eventi di signaling cellulare.

Oltre al recettore BCR, sempre a livello della membrana cellulare, è presente anche il co-recettore **CD19**, associato ad una proteina adattatrice chiamata **BCAP (B-cell adapter)**. Le chinasi appartenenti alla famiglia Src hanno la capacità di fosforilare anche i residui di tirosina sul recettore CD19; la **fosforilazione** facilita l'attivazione ed il reclutamento della **fosfatidil-inositolo-3-chinasi PI3K**, tramite il legame di quest'ultima e BCAP. PI3K è un enzima di fondamentale nel percorso che porta all'espressione di BTK, in quanto catalizza la reazione che porta alla formazione del **fosfatidil-inositolo-trifosfato (PIP3)**, molecola che agisce come secondo messaggero interagendo con il dominio PH della chinasi. Questo è un evento di fondamentale importanza, in quanto permette il reclutamento di BTK dal citoplasma verso la **membrana cellulare** e i successivi passaggi di trasduzione del segnale correlati alla chinasi. ⁴⁴

La subunità α del complesso CD79a/CD79b contiene anche un residuo tirosinico **non-ITAM**: tramite fosforilazione, ha il compito di attivare e reclutare **SLP65/BLNK**, una proteina che funge da linker per i linfociti B. In seguito, l'adattatore **CIN85** oligomerizza SLP65, permettendo l'assemblaggio di complessi intracellulari di segnale che attivano i linfociti B. SLP65 agisce quindi come proteina di sostegno per varie molecole di segnale, tra cui anche la tirosina-chinasi di Bruton.

Dopo essere stata fosforilata dalle chinasi della famiglia Src, BTK deve operare un'autofosforilazione del residuo tirosinico Y223 per attivarsi completamente. Una volta attivata, può compiere un'ulteriore **fosforilazione** nei confronti di **PLC γ 2**, enzima chiave per la generazione di **secondi messaggeri**. La fosfolipasi ha infatti la capacità di idrolizzare il PIP2 a **inositolo trifosfato (IP3)** e **diacilglicerolo (DAG)**, elementi fondamentali negli ultimi passaggi di trasduzione del segnale. ⁴⁴

- **IP3** attiva i canali del **calcio**, permettendo il trasporto all'interno del nucleo del **fattore nucleare dei linfociti T attivati (NFAT)**, del quale attiva la trascrizione
- **DAG** favorisce l'attivazione della **protein-chinasi C- β (PKC β)**, che determina l'attivazione di molti membri della famiglia **MAPK (mitogen-associated protein kinase)** e del fattore di trascrizione **NF κ B (nuclear factor kappa B)**. Le chinasi MAPK sono coinvolte nella gestione della risposta cellulare in seguito all'esposizione a svariati stimoli, regolano numerosi processi cellulari tra cui proliferazione, espressione genica e differenziazione, così come sopravvivenza ed apoptosi.

NFAT e NF- κ B regolano l'espressione di diversi geni cruciali per la sopravvivenza e la proliferazione dei linfociti B, come anche della proteina antiapoptotica Bcl-xL; vanno inoltre a mediare il rilascio di citochine e chemochine

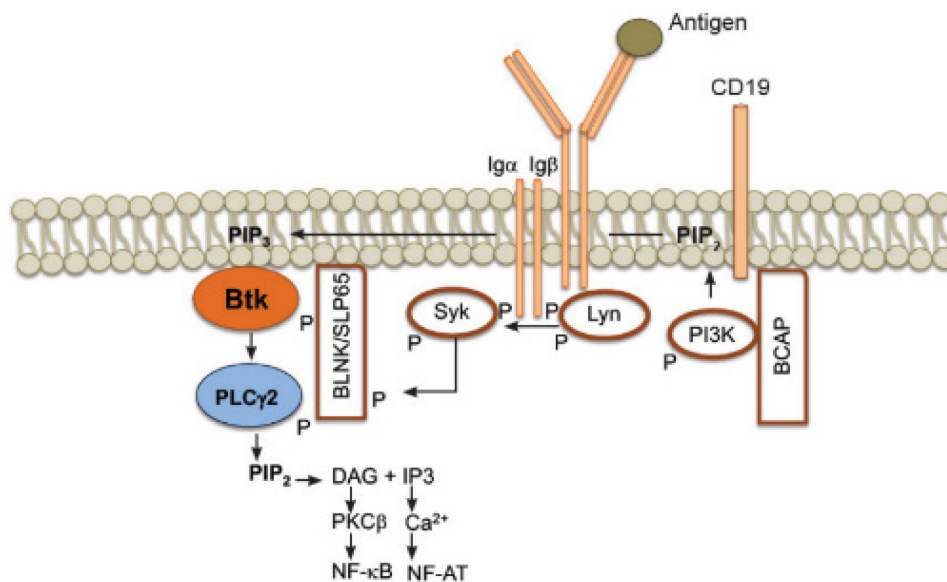


Figura 50: Trasduzione del segnale attraverso il recettore BCR dei linfociti B

Oltre a BTK, tramite la cascata del segnale di BCR viene reclutata anche la serin-treonin chinasi **AKT**, conosciuta anche col nome di protein chinasi B. Una volta attivata grazie all'interazione tra il suo dominio PH e il fosfatidilinositolo-trifosfato (PIP₃), questa chinasi promuove i percorsi di segnale che coinvolgono alcuni fattori di trascrizione, tra i quali anche NFAT e NF- κ B descritti in precedenza, contribuendo quindi alla regolazione dell'attività immunitaria dei linfociti B.

8.6 Funzioni di BTK non correlate al recettore BCR

La via di trasduzione del segnale correlata al recettore BCR non è l'unico pathway cellulare che coinvolge la tirosina-chinasi di Bruton; essa, infatti, può venire reclutata anche tramite altre vie di segnalazione, come quelle che vedono coinvolti i **recettori per le chemochine**, i **toll-like receptors (TLRs)** e i **recettori Fc**.⁴⁴

I **toll-like receptors** sono proteine che svolgono un ruolo fondamentale nelle risposte immunitarie, in particolare nel riconoscimento dei patogeni presenti nella matrice extracellulare, in quanto vengono direttamente coinvolti nella regolazione delle reazioni infiammatorie e nell'attività delle risposte immunitarie innate o adattative, volte all'eliminazione di agenti patogeni infettivi. Sono espressi nei linfociti B oltre che nelle cellule mieloidi, e ne esistono di vari tipi, ma BTK è in grado di influenzare il segnale solo dei recettori **TLR2**, **TLR3**, **TLR4**, **TLR7/8** e **TLR9**.⁴⁵ Come illustrato nell'immagine sottostante, una volta attivati, i recettori toll-like reclutano la proteina codificata dal gene **MYD88**, la quale ha la capacità di attivare una chinasi chiamata **IRAK1**; per farlo, può servirsi anche della molecola adattatrice **MAL**, la quale contribuisce alla cascata del segnale. BTK interagisce con diversi componenti di questo pathway cellulare, che porta all'induzione di alcuni fattori di trascrizione, uno di questi è **NF-κB**.⁴⁴

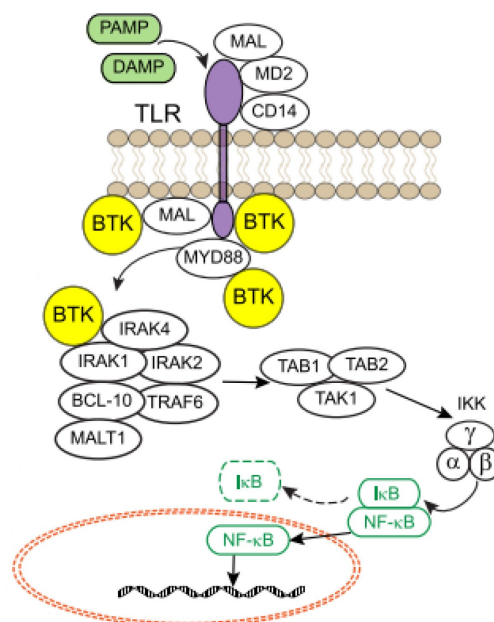


Figura 51: Trasduzione del segnale dei TLRs che coinvolge BTK

Un'altra via di trasduzione del segnale che vede coinvolta la tirosina-chinasi di Bruton è quella dei **recettori Fc** (figura 52).

Sono proteine che si trovano sulla superficie di alcune cellule del sistema immunitario, inclusi i linfociti B. Si chiamano così perché hanno la capacità di interagire con la parte costante **Fc** degli anticorpi, la quale, legandosi, attiva la cascata del segnale. BTK è coinvolta nella segnalazione di questi recettori, i quali possono regolare l'attività della chinasi sia in **positivo** che in **negativo**. In particolare, i recettori Fc di **tipo γ** possono avere due tipi di sequenze amminoacidiche, che prendono il nome di residui **ITAM** e **ITIM**; il primo, già visto in precedenza con il recettore BCR, determina l'attivazione della cascata del segnale, la quale comincia con la fosforilazione di un residuo tirosinico da parte delle chinasi Src per poi continuare con il reclutamento di altre chinasi, tra le quali anche BTK, favorendo processi immunitari come la fagocitosi da parte dei macrofagi. Il **secondo motivo** è invece **inibitorio** e i recettori che lo esprimono regolano in negativo la trasduzione del segnale che determina gli effetti immunitari e pro-infiammatori; l'azione di particolari enzimi, che rimuovono i gruppi fosfato dai residui di tirosina, inibisce l'attività delle chinasi che dirigono la cascata di trasduzione del segnale, tra le quali compare anche BTK. ⁴⁴

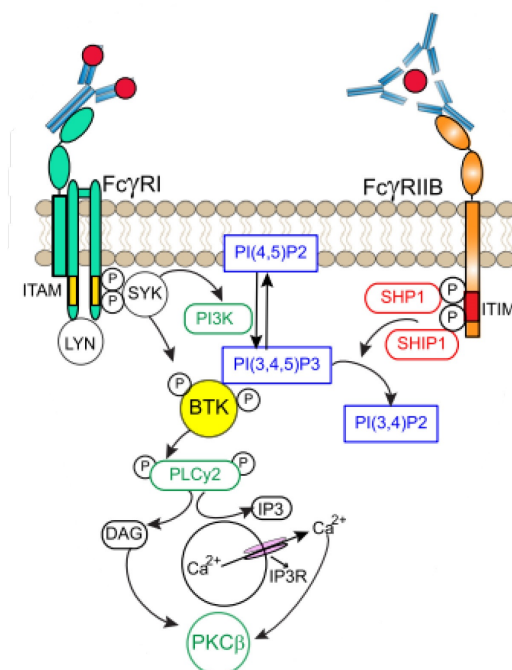


Figura 52: Trasduzione del segnale dei recettori Fc che coinvolge BTK

I **recettori per le chemochine** (figura) sono accoppiati a **proteine G** intracellulari eterotrimeriche, composte dalle subunità α , β e γ ; nei linfociti B sono espressi i recettori **CXCR4** e **CXCR5**, i quali svolgono importanti ruoli al fine di mantenere l'omeostasi cellulare. Quando la chemochina si lega al dominio extracellulare del recettore, vengono indotti cambiamenti conformazionali che provocano la **dissociazione** delle subunità **G α** e **G $\beta\gamma$** , che sono in grado di attivare la fosfatidilinositolo-3-chinasi (**PI3K**). Come già visto, quest'ultima ha la capacità di attivare diversi tipi di chinasi, tra le quali anche BTK. Le subunità possono anche legarsi direttamente alla tirosina chinasi di Bruton, promuovendone l'attività.⁴⁴

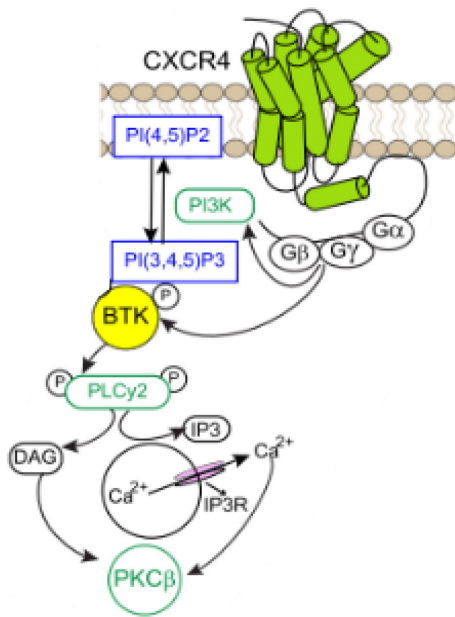


Figura 53: Trasduzione del segnale di CXCR4 che coinvolge BTK

8.7 Regolazione di BTK

Come descritto in precedenza, i recettori Fc coinvolti nel segnale di BTK possono favorire l'attività della chinasi oppure promuoverne l'inibizione. La **regolazione** della chinasi di Bruton è di fondamentale importanza, in quanto un corretto bilanciamento tra attività positiva e negativa favorisce l'omeostasi dei linfociti B, sfavorendo la nascita di scompensi che possono alterare i processi cellulari. L'attività chinastica della famiglia Tec può essere regolata negativamente attraverso il recettore **Fc γ RIIB** da almeno due meccanismi distinti: il primo è la **defosforilazione** di PIP3 da parte di **SHIP (SH2 domain containing inositol polyphosphate 5'phosphatase-1)**, il secondo è il meccanismo di **downregulation** mediato da **SHP1 (SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase-1)**. Il recettore inibitorio Fc γ RIIB è espresso esclusivamente nei linfociti B e contiene un motivo **ITIM** (immune tyrosine inhibitory motifs) all'interno del suo dominio citoplasmatico (Figura 52), in contrasto con il motivo ITAM descritto nella trasduzione del segnale indotta da BCR. Il legame di anticorpi IgG al recettore Fc stimola la **fosforilazione** del

residuo ITIM da parte della chinasi **Lyn**; questo evento determina l'attivazione delle molecole **SHIP** e **SHP1**: la prima ha la funzione di defosforilare il **fosfatidilinositolo-trifosfato** provocando l'inibizione del reclutamento di BTK a livello della membrana cellulare, mentre SHP1 ha la capacità di defosforilare **residui tirosinici** riducendo l'attività della chinasi.^{43,44}

9. INIBITORI DI BTK

Negli ultimi due decenni è stato sviluppato un numero sempre crescente di DMTs per il trattamento della sclerosi multipla. Tuttavia, data l'eterogeneità della malattia e l'esistenza di pazienti refrattari agli attuali schemi di trattamento, è necessario innovare le alternative terapeutiche. D'altra parte, poiché diverse fonti di evidenza indicano che sia i linfociti B che le cellule mieloidi sono importanti per lo sviluppo della SM, c'è stato un grande interesse nello sviluppo degli inibitori di BTK.⁵²

Come già illustrato nel precedente capitolo, la trasduzione del segnale attraverso i recettori BCR ed Fc dei linfociti B dipende da BTK. Poiché quest'ultima è espressa nei linfociti B, nei macrofagi, nei monociti e nella microglia, ma non nei linfociti T, nel corso degli anni gli inibitori di BTK sono stati approvati ed utilizzati principalmente nei tumori maligni che coinvolgono i linfociti B. Data l'efficacia che hanno dimostrato e dato che i cambiamenti a livello genetico di BTK mostrano un'alterata risposta delle cellule B, gli inibitori della chinasi rappresentano una promettente opzione terapeutica per le malattie autoimmuni come la sclerosi multipla.⁵³

Uno dei grandi passi avanti che sono stati fatti nella terapia dei tumori maligni è rappresentato da Ibrutinib; sintetizzato nel 2007, questo inibitore di BTK è stato approvato per il **linfoma mantellare**, la **leucemia linfatica cronica (CLL)** e la **macrolobulinemia di Waldenstrom**.⁴² È un inibitore irreversibile, in quanto per legarsi alla tirosina-chinasi di Bruton forma un legame di tipo covalente; tuttavia, inibisce anche un gran numero di chinasi diverse da BTK, come ITK, EGFR e TEC, di conseguenza la sostanziale attività fuori bersaglio ne preclude la valutazione e l'impiego nelle malattie autoimmuni.⁵² Anche gli effetti avversi come aritmie cardiache, diarrea o sanguinamenti, dovuti a questi effetti off-target su altre chinasi, impediscono l'utilizzo di Ibrutinib nel trattamento di patologie come la sclerosi multipla. Ecco quindi che negli anni la ricerca ha tentato di sintetizzare dei composti simili a Ibrutinib, che potessero essere ugualmente efficaci, ma dotati di maggior selettività verso BTK, riducendo di conseguenza anche gli effetti collaterali e migliorando la tollerabilità complessiva.⁵² Cinque inibitori orali della chinasi di Bruton sono attualmente in fase di studio per il trattamento della SM: **Evobrutinib**, **Tolebrutinib**, **Fenebrutinib**, **Remibrutinib** e **Orelabrutinib**. Ad oggi, però, nessuna di queste molecole è stata approvata nel trattamento delle malattie autoimmuni, in quanto la maggior parte degli studi di fase III che potrebbero confermare definitivamente l'efficacia non sono ancora stati conclusi.⁵³

9.1 Effetti dell'inibizione di BTK

Come dimostrato da esperimenti in vitro e in vivo, l'inibizione di BTK influisce sui fattori nucleari essenziali per la maturazione, la proliferazione e la produzione di citochine da parte delle cellule B. L'alterazione dei segnali a valle generati dal recettore BCR sembra essere il meccanismo d'azione più importante degli inibitori di BTK nei linfociti B.⁴² Oltre a BCR, l'interferenza con la segnalazione di altri recettori presenti nelle cellule del sistema immunitario innato può contribuire in modo significativo all'effetto terapeutico: alcuni studi effettuati utilizzando gli inibitori di BTK, hanno dimostrato la loro efficacia nell'alterazione delle vie di trasduzione del segnale regolate dalla chinasi. Le molecole hanno determinato la soppressione di funzioni effettrici cellulari a valle, sia nei linfociti B che nelle cellule mieloidi, quali: attivazione, proliferazione e differenziazione delle cellule B; fosforilazione della PLC γ 2 indotta dal recettore BCR e presentazione dell'antigene alle cellule T; generazione di ROS indotta dal recettore Fc dei neutrofilo e secrezione di TNF da parte dei monociti.⁵³

Inoltre, l'espressione della tirosina-chinasi di Bruton nelle cellule microgliali e la capacità di attraversare la BEE che hanno gli inibitori di piccole dimensioni, sollevano la possibilità di modulare in maniera efficace le cellule della microglia attivate nella sclerosi multipla. Complessivamente, gli effetti centrali provocati dall'azione degli inibitori di BTK possono essere riassunti dalla *figura 54*:⁴⁵

- Blocco dell'attivazione delle cellule della microglia, le quali esprimono la tirosina-chinasi di Bruton
- Influenza sugli oligodendrociti ed i loro precursori, con conseguente promozione della rimielinizzazione a livello degli assoni
- Prevenzione della migrazione delle cellule immunitarie periferiche verso il sistema nervoso centrale

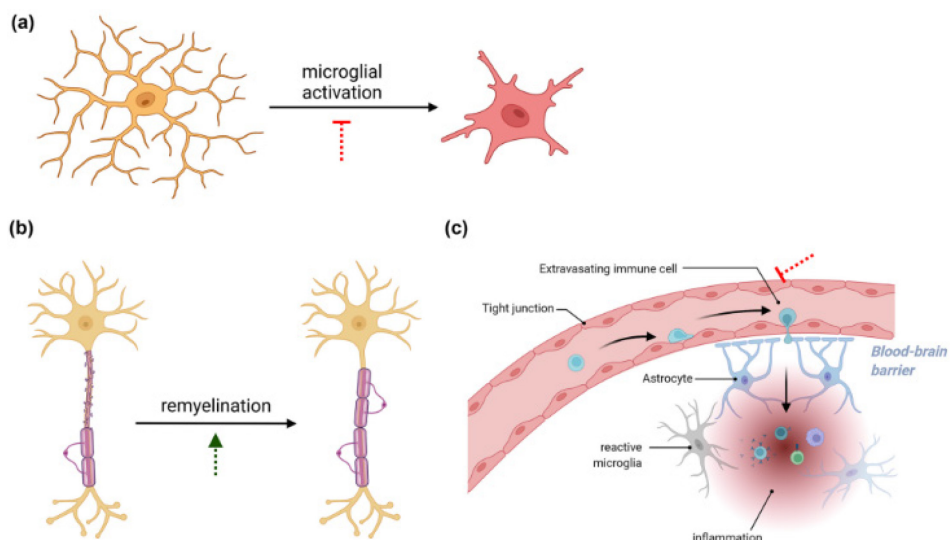


Figura 54: Processi sfavoriti o favoriti dall'inibizione di BTK: a) inibizione dell'attivazione della microglia; b) promozione della rimielinizzazione; c) inibizione del transito di cellule immunitarie dalla periferia al SNC

La somma dei meccanismi d'azione favoriti dal legame degli inibitori con BTK l'attenuazione della risposta immunitaria a livello centrale, la quale si traduce in una riduzione dell'infiammazione e dei sintomi correlati al danno neuronale tipici della sclerosi multipla.

9.2 Classificazione

Una possibile classificazione degli inibitori di BTK in reversibili o irreversibili si basa sul legame che formano con la chinasi; gli inibitori **irreversibili** stabiliscono un legame covalente con la **cisteina-481**, un residuo fondamentale presente nel sito di legame dell'ATP. Quelli reversibili si legano invece debolmente a una **tasca specifica** nel dominio **SH3** di BTK, attraverso legami idrogeno, legami ionici o interazioni idrofobiche, facendo assumere alla chinasi una conformazione inattiva.⁵³ Rappresentano una valida alternativa nelle persone con tumori maligni dei linfociti B che possiedono mutazioni della cisteina e di conseguenza non rispondono agli inibitori irreversibili.⁴²

Tra le molecole attualmente in fase di sperimentazione per la sclerosi multipla, Evobrutinib, Tolebrutinib, Orelabrutinib e Remibrutinib sono inibitori irreversibili, mentre solo Fenebrutinib è classificato come reversibile.

In generale, gli inibitori covalenti irreversibili raggiungono affinità di legame più elevate e hanno una durata d'azione più lunga; ciò potrebbe aumentare la loro potenza e portare ad una riduzione

della dose o della frequenza richieste nella somministrazione. Di contro, però, possono presentare problemi di sicurezza legati alla potenziale immunogenicità dei complessi farmaco-recettore legati covalentemente, oltre che dei loro prodotti di degradazione.⁵³

9.3 Vantaggi

Una delle caratteristiche degli inibitori di BTK che ha portato ad investire nella ricerca è la loro dimensione: essendo molecole piccole, presentano alcuni vantaggi rispetto ad altri farmaci già approvati ed immessi sul mercato, come la possibilità di somministrazione orale, di risparmiare sui costi di produzione e una più semplice modulazione biologica.⁴² La capacità di attraversare la barriera emato-encefalica è sicuramente un vantaggio di grande rilevanza perché, come sappiamo, i processi di infiammazione e neurodegenerazione che portano allo sviluppo della sclerosi multipla avvengono all'interno del sistema nervoso centrale; gli inibitori di BTK possono in questo modo agire non solo nelle aree periferiche, ma anche a livello delle cellule direttamente responsabili dei processi di demielinizzazione e danno agli assoni.⁵³

Alcune evidenze scientifiche hanno rivelato che le risposte anticorpali contro il farmaco, le quali porterebbero a conseguenti reazioni allergiche nei soggetti, si verificano con una probabilità inferiore quando vengono utilizzati inibitori di BTK, ma solo ulteriori studi saranno in grado di fornire aggiornamenti e risposte precise in merito a questo tema.⁵²

Inoltre, gli inibitori di BTK potrebbero presentare potenziali vantaggi rispetto agli anticorpi monoclonali che eliminano le cellule B, poiché modulano anche la funzione delle cellule mieloidi. Tuttavia, non è ancora stato stabilito se l'efficacia degli inibitori di BTK sia superiore a quella degli anticorpi monoclonali, come non è completamente chiaro se le alte concentrazioni di inibitori di BTK utilizzate in vitro siano raggiungibili in vivo nel cervello dei pazienti con sclerosi multipla.⁵³

Un ultimo vantaggio riconducibile agli inibitori di BTK di seconda generazione come Evobrutinib e Tolebrutinib riguarda la loro selettività: come precedentemente descritto, alcune molecole come Ibrutinib hanno un'elevata efficacia, ma non hanno la capacità di essere specifiche solo nei confronti della chinasi di Bruton. Questo crea scompensi dovuti agli effetti off-target provocati dall'inibizione di altre chinasi, che possono determinare effetti collaterali indesiderati. Con gli inibitori di seconda generazione viene aumentata la selettività e limitata l'azione farmacologica su altre proteine, migliorando così il profilo di tossicità delle molecole.⁵³

9.4 Limitazioni

D'altra parte, gli inibitori di BTK per le malattie autoimmuni presentano anche alcuni svantaggi; in primo luogo, studi recenti hanno scoperto bersagli anche non chinasi da parte di queste molecole: l'alterazione di strutture diverse dalla chinasi di Bruton potrebbe anche non comportare particolari effetti negativi, ma in alcuni casi contribuisce allo sviluppo di attività indesiderate degli inibitori. Ciò può avvenire anche a livello di chinasi diverse da BTK, le quali possono presentare domini strutturali simili, come la cisteina in posizione 773 nelle chinasi della famiglia EGFR; quest'ultime non sono coinvolte nella sclerosi multipla, di conseguenza la loro inibizione potrebbe provocare danni tissutali indesiderati.⁵²

Un altro problema che potrebbe insorgere è correlato alla possibilità di resistenza al trattamento a causa di mutazioni della cisteina in posizione 481 su BTK, sito di legame per gli inibitori irreversibili; un'alterazione a questo livello può modificare l'efficacia delle molecole e rendere inefficace il loro effetto farmacologico.⁵²

La maggior parte delle evidenze scientifiche estrapolate dagli studi effettuati sugli inibitori di BTK derivano dal modello animale, il quale non può essere sempre affidabile e riproducibile nei pazienti umani affetti da sclerosi multipla. Ecco perché la comparsa di inibitori di seconda generazione come Evobrutinib e Tolebrutinib ha aperto nuove strade per la ricerca, ma sono necessari studi più lunghi e ampi per determinare con precisione l'efficacia e i rischi di queste molecole.

9.5 Meccanismo d'azione

L'approfondimento della struttura e della funzione dei domini di BTK ha favorito lo sviluppo di molecole che potessero formare legami stabili con essi e determinare l'inibizione della chinasi. I principali requisiti per il successo di un inibitore riguardano la forma, la quale deve essere complementare con la proteina bersaglio, le dimensioni adeguate per interagire al meglio nello spazio, i gruppi funzionali e le cariche che instaurano un legame efficiente con i residui critici del sito di legame, come la cisteina in posizione 481 o la tirosina in 551.⁵⁴

Gli inibitori irreversibili di BTK in sperimentazione per il trattamento della sclerosi multipla come Evobrutinib e Tolebrutinib formano un legame covalente con la chinasi e sono accomunati dalla presenza di una **parte carbonilica** all'interno della loro struttura, la quale funge da innesco per la formazione del legame irreversibile con la **Cys481** di BTK. Questo legame viene ulteriormente stabilizzato da altre interazioni che interessano l'**asparagina** in posizione **484**, l' **α -elica C** e il **dominio SH3** della chinasi. Un modello strutturale funzionale per un inibitore covalente deve possedere quattro distinte entità chimiche: il **gruppo carbonilico α , β -insaturo**, uno **spaziatore**

eterociclico saturo, un **nucleo eterociclico aromatico** e **anelli lipofili** che favoriscono la complementarità del sito di legame.⁵⁴ Inoltre, i diversi inibitori covalenti hanno caratteristiche strutturali diverse e stabilizzano il dominio della chinasi in conformazioni diverse. Pertanto, il legame degli inibitori covalenti alla BTK deve essere studiato a fondo per comprendere meglio le modificazioni conformazionali della chinasi e di altri domini.

La resistenza agli inibitori irreversibili e i loro effetti avversi hanno spinto la ricerca a sintetizzare altre molecole che potessero inibire BTK attraverso un legame meno potente, in modo da limitare gli effetti collaterali e disporre di un'alternativa utilizzabile nelle patologie che colpiscono i linfociti B. Gli **inibitori non covalenti** sono stati testati contro i tumori maligni e le malattie autoimmuni e hanno dimostrato proprietà farmacocinetiche sicure in vitro o in vivo. Essi si legano al dominio chinasi di BTK tramite **interazioni idrofobiche** o **legami a idrogeno**, ma non formano legami di tipo covalente. L'interazione con la **tirosina** in posizione **551** nel loop di attivazione di BTK è essenziale per favorire l'adattamento degli inibitori alla struttura della chinasi. Per poter essere compatibili con BTK a livello strutturale, gli inibitori non covalenti devono contenere **anelli lipofili** ingombranti per determinare la selettività della chinasi ed un **nucleo eterociclico**, come nel caso degli inibitori irreversibili.⁵⁴

Ad oggi, i dati raccolti dagli studi effettuati sulla complementarità strutturale degli inibitori reversibili ed irreversibili non sono sufficienti, pertanto saranno necessari ulteriori studi che analizzino più nel dettaglio l'interazione strutturale tra BTK e le molecole che la inibiscono, in modo da migliorare la progettazione di nuovi farmaci clinicamente efficaci e utilizzabili nelle patologie autoimmuni.

9.6 Inibitori irreversibili

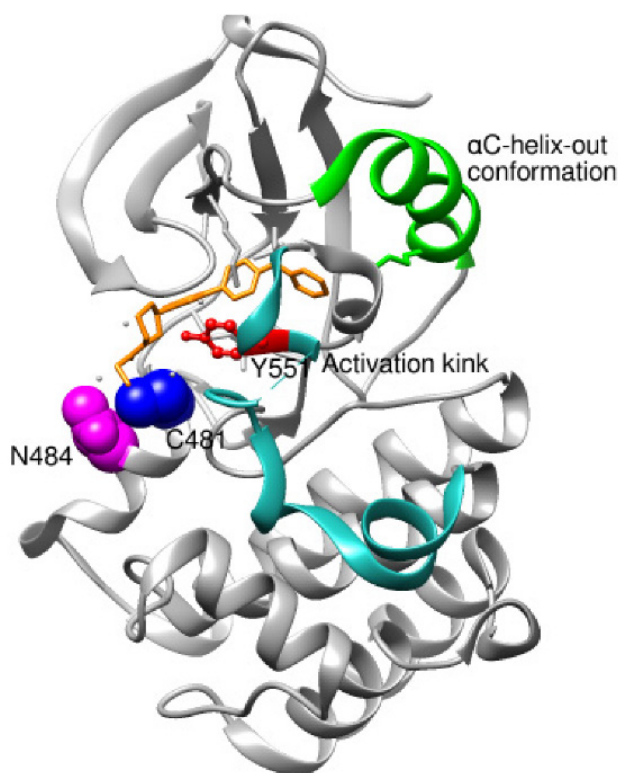


Figura 55: Interazione dell'inibitore di BTK Ibrutinib con la chinasi e formazione del legame covalente irreversibile

Nell'esempio della *Figura 55* è raffigurato il legame che forma l'inibitore irreversibile **Ibrutinib** con BTK; come già accennato in precedenza, gli inibitori covalenti sfruttano la parte carbonilica insatura nella loro struttura per formare il legame covalente con il residuo **Cys481** di BTK; questo evento determina un'alterazione della conformazione dell' α -elica C, la quale viene stabilizzata in una conformazione **α C-out inattiva**, con conseguente inibizione della fosforilazione di **Tyr551** nel loop di attivazione della chinasi. Gli **anelli lipofili** presenti nella struttura degli inibitori sono necessari per aumentare la massa e facilitare l'occupazione del sito di legame per stabilire interazioni idrofobiche con altri residui del sito catalitico.

Generalmente, l' α -elica C può assumere disposizioni spaziali inattive (**α C-elica-out**) o attive (**α C-elica-in**), controllate da una **spina strutturale regolatoria**, la quale determina la formazione di un **ponte salino** tra residui di **acido glutammico-lisina** nel dominio della chinasi. (*vedi paragrafo 6.2*) Nel momento in cui avviene il legame con Ibrutinib, l'elica viene forzata nella conformazione out, la formazione del ponte salino viene inibita e la chinasi verrà mantenuta in uno stato inattivo, inibendo così la sua attività catalitica.⁵⁴

È stato visto come nel momento del legame alla chinasi, lo stato di transizione degli inibitori irreversibili viene favorito anche attraverso il residuo **Asn484**, che si trova a una distanza di due carboni dalla cisteina; questo residuo amminoacidico interagisce con Cys481 durante l'intero processo che porta alla formazione del legame, e si è rivelato essenziale per stabilizzare gli intermedi della reazione nucleofila.⁵⁴

Il legame covalente degli inibitori irreversibili induce anche cambiamenti conformazionali nel dominio **SH3**, inibendo così l'autofosforilazione di **Tyr223** che BTK dovrebbe effettuare per attivarsi completamente.⁵⁴ (*vedi paragrafo 7.3*)

In ogni caso, è bene ricordare che, sebbene gli inibitori irreversibili di BTK come Evobrutinib e Tolebrutinib inattivino irreversibilmente BTK, la segnalazione viene ripristinata in circa 5-7 giorni, poiché l'enzima inattivato viene gradualmente sostituito attraverso il normale turnover proteico.⁵³

Attualmente, gli inibitori irreversibili in sperimentazione come possibile trattamento nella sclerosi multipla sono Evobrutinib, Tolebrutinib, Remibrutinib ed Orelabrutinib.

9.7 Inibitori reversibili

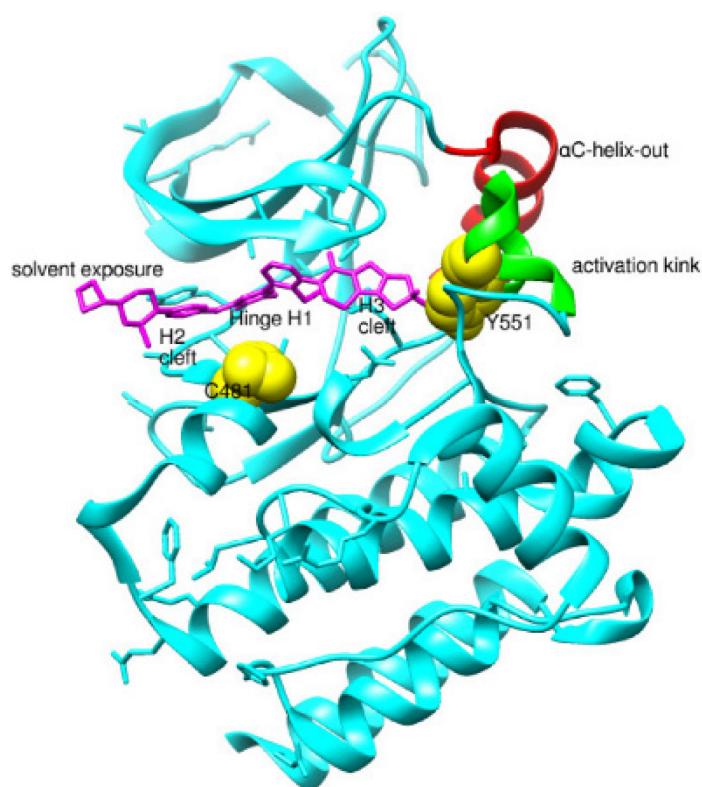


Figura 56: Interazione dell'inibitore reversibile di BTK Fenebrutinib con la chinasi

idrofobiche, ma non legami covalenti; il risultato dell'interazione tra inibitore e residuo tirosinico è l'**inibizione dell'autofosforilazione** di BTK, che determina una stabilizzazione della forma inattiva e blocca la trasduzione del segnale.⁵⁴

Anche nel caso degli inibitori reversibili viene stabilizzata la conformazione dell'**α-elica C out**, con conseguente aggancio esteso dei ligandi che porta ad un'inibizione prolungata. Alcuni nuovi inibitori non covalenti hanno mostrato di potersi legare anche al dominio **PH** di BTK, rivelandosi efficaci contro mutazioni che possono formarsi a livello dei residui amminoacidici che sono coinvolti nelle interazioni inibitore-chinasi.

La Figura 56 mostra l'interazione con BTK da parte dell'inibitore reversibile **Fenebrutinib**, attualmente in fase di sperimentazione nella sclerosi multipla. L'azione della molecola determina un cambiamento conformazionale nel **loop di attivazione** di BTK, il quale ne stabilizza la forma inattiva. Il legame tramite **anello triciclico lipofilo** con la **Tyr551** nel loop di attivazione è essenziale per favorire l'adattamento degli inibitori non covalenti agli slot **H3** e **H2** della chinasi. L'inibitore può interagire con Tyr551 attraverso **legami idrogeno** o **interazioni**

La ricerca sugli inibitori di BTK reversibili sta procedendo verso l'ottimizzazione della selettività, della potenza e della riduzione degli effetti collaterali. Questi sono diminuiti quando sono stati modificati i gruppi funzionali che interagiscono con le scanalature **H2** e **H3**; in particolare si ottiene beneficio quando i gruppi che legano **H3** sono **anelli planari biciclici** o **triciclici** altamente **lipofili**, e quelli che creano interazioni con **H2** sono **meno lipofili**. I gruppi leganti la porzione H3 permettono anche di ottenere selettività verso BTK, riducendo i cosiddetti effetti "off-target". Infine, la parte della struttura che interagisce con il solco **H1** costituisce il nucleo della struttura, che solitamente è un **eterociclo aromatico**.⁵⁴

9.8 Sicurezza e tollerabilità

Il profilo di tossicità degli inibitori di BTK è influenzato da se e a quali altre chinasi si legano oltre a BTK, provocando i cosiddetti effetti "off-target" dei farmaci. Rispetto agli inibitori di prima generazione come Ibrutinib, i quali si legano anche ad altre chinasi della famiglia TEC e ad altre tirosin-chinasi, gli inibitori di BTK di **seconda generazione** in studio nella SM si legano solo a un piccolo numero di altre chinasi. Si prevede che questa maggiore selettività si traduca in minor numero di effetti fuori bersaglio e **minor rischio** di cardiotossicità o di eventi avversi comunemente osservati, come aritmie cardiache, sanguinamenti, diarrea, ipertensione ed eruzioni cutanee, i quali potrebbero richiedere l'interruzione del trattamento.⁵³

Ad oggi, due **studi di fase II** hanno dimostrato che gli inibitori di BTK limitano l'attività di malattia nei pazienti con sclerosi multipla e presentano profili di tollerabilità e sicurezza favorevoli.⁵³ Sebbene i gravi effetti avversi degli inibitori di BTK osservati nei pazienti con neoplasie non siano ancora stati riportati nei soggetti con SM, i periodi di osservazione sono troppo brevi per consentire una valutazione completa di questi aspetti. I profili di sicurezza degli inibitori di BTK potrebbero inoltre variare tra la sclerosi multipla e altre malattie che vengono trattate con questi agenti, a causa della presenza di processi fisiopatologici diversi.

9.9 Potenza ed efficacia

L'efficacia dei diversi inibitori di BTK nei pazienti con SM è influenzata da variazioni farmacodinamiche e farmacocinetiche tra le varie molecole. I dati attuali indicano che la **potenza** degli inibitori di BTK varia notevolmente: ad esempio, **Evobrutinib** richiede dosi più elevate per raggiungere la concentrazione inibente **IC50** (la dose di farmaco in grado di inibire il 50% del bersaglio) rispetto a **Tolebrutinib** e **Fenebrutinib**. Anche i valori di **EC50**, la concentrazione di farmaco che esercita il 50% dell'effetto, differiscono da inibitore a inibitore: per sopprimere l'attivazione dei linfociti B è stato visto come Fenebrutinib abbia registrato un'efficacia superiore

a Tolebrutinib (EC50 di 15nM contro gli 80nM di Tolebrutinib) e di gran lunga superiore ad Evobrutinib, la cui EC50 è di 1271nM. È importante però ricordare che, quando si confrontano questi valori, bisognerebbe sempre considerare la natura degli inibitori di BTK, in quanto la cinetica di legame degli irreversibili non è all'equilibrio come per quelli reversibili, e questo potrebbe presentare delle problematiche nel confronto tra i due tipi di inibitori.⁵³

9.10 Fenebrutinib

Fenebrutinib è un inibitore reversibile che non interagisce con la cisteina-481; al contrario, forma legami a idrogeno con i residui di **lisina-430**, **aspartato-539** e **metionina-477** presenti nel dominio di BTK. La molecola è in grado di indurre un cambiamento conformazionale che inattiva la chinasi, impedendo l'attivazione dei fattori di trascrizione a valle della cascata di trasduzione del segnale. (vedi IMMAGINE sopra)⁴²

In uno studio effettuato su topi, Fenebrutinib ha dimostrato di influenzare anche l'attività delle cellule della **microglia**: la somministrazione del farmaco è iniziata 2 giorni prima dell'induzione dell'**encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE)**, favorita dall'immunizzazione attraverso **MOG35-55**, una proteina in grado di provocare una reazione immunitaria demielinizzante. Nei topi che hanno ricevuto il farmaco, è stato determinato un abbassamento dei punteggi di gravità della malattia rispetto a quelli che non avevano ricevuto Fenebrutinib, a causa di una riduzione dell'attivazione delle cellule della microglia.⁵³

In alcuni studi clinici di fase II, Fenebrutinib è stato testato in patologie come il **lupus eritematoso sistemico** e l'**artrite reumatoide**, mentre per quanto riguarda la sclerosi multipla sono in corso 3 studi di fase III:⁴²

- **FENTrepid**, il quale vuole valutare l'efficacia e la sicurezza del farmaco sulla progressione della disabilità in soggetti adulti affetti da sclerosi multipla primariamente progressiva (PPMS); lo studio ha come obiettivo analizzare il confronto tra Fenebrutinib e l'anticorpo anti-CD20 **Ocrelizumab**; i partecipanti idonei sono stati randomizzati nella somministrazione giornaliera di Fenebrutinib contro placebo e di Ocrelizumab contro placebo in cieco. È stato stimato che la conclusione di FENTrepid avverrà nel dicembre 2026⁴²
- **FENhance 1 e 2**, due studi in doppio cieco che vogliono valutare l'efficacia e la sicurezza di Fenebrutinib rispetto a Teriflunomide in pazienti con sclerosi multipla recidivante; sono stati reclutati 736 pazienti ai quali è stato somministrato o l'uno o l'altro farmaco, mantenendo sempre un gruppo di controllo con placebo. Gli studi puntano a confrontare

l'efficacia dei due farmaci considerando l'**indice di ricadute annuale (ARR)**; è stimato che a novembre 2025 verranno conclusi entrambi gli studi ⁴²

9.11 Orelabrutinib

Orelabrutinib è un potente BTKi **irreversibile** di seconda generazione, sviluppato per i tumori maligni delle cellule B e le malattie autoimmuni, compresa la SM. È in corso uno **studio** clinico di **fase II** avviato nel 2021, randomizzato e in doppio cieco, su 160 pazienti con SM recidivante-remittente. Ad ognuno è stato assegnato in modo casuale il placebo o una dose di Orelabrutinib fra 3 possibili: 50mg una volta al giorno, 50mg due volte al giorno o 80mg una volta al giorno. L'obiettivo principale dello studio era la valutazione di **nuove lesioni cerebrali** con infiammazione attiva dopo 12 settimane. Secondariamente, sono stati valutati anche **sicurezza** e **tasso di ricaduta annuale** del farmaco. Le analisi dei risultati hanno rilevato che Orelabrutinib ha provocato riduzioni significative dose-dipendenti delle lesioni, rispetto al placebo. In particolare, i pazienti a cui è stata somministrata una singola dose giornaliera di 50mg, hanno registrato una riduzione delle lesioni del **71,1%**, mentre quelli a cui erano state assegnate due dosi giornaliere hanno ottenuto una riduzione dell'**80,8%**. Ma l'efficacia maggiore è stata osservata nei pazienti che hanno ricevuto la dose di **80mg**, i quali hanno sviluppato il **92,1%** in meno di lesioni rispetto a quelli che avevano assunto il placebo. ⁵⁵

9.12 Remibrutinib

Remibrutinib è un inibitore di BTK orale, selettivo e irreversibile, che si lega covalentemente alla cisteina-481 e possiede un tempo di emivita compreso tra 1 e 2 ore. Sono in corso due identici studi di fase III su Remibrutinib che vogliono misurarne l'efficacia nella sclerosi multipla con recidive confrontandolo con Teriflunomide. Come end point primario si valuterà l'indice di ricadute annuali (ARR). Gli 800 partecipanti allo studio sono stati assegnati in modo casuale alla somministrazione di Remibrutinib o Teriflunomide in rapporto 1:1. Completato lo studio i soggetti potranno decidere di continuare la terapia e venire reclutati per un'estensione dello studio a lungo termine, della durata di 5 anni. ⁵⁰

9.13 Evobrutinib

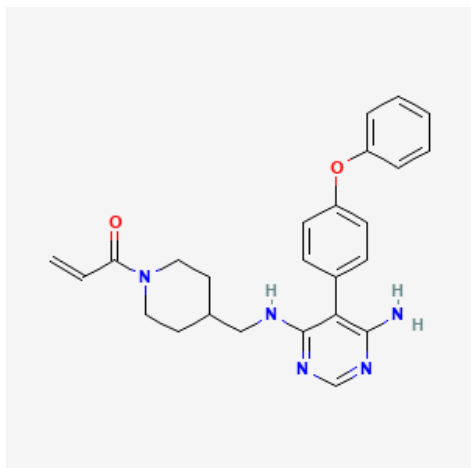


Figura 57: Struttura chimica di Evobrutinib

Evobrutinib è un nuovo inibitore BTK orale e irreversibile con un'elevata selettività della chinasi, che può essere adatto al trattamento cronico delle malattie autoimmuni, inibendo la segnalazione mediata da BCR e FcR γ . Si lega covalentemente alla **cisteina-481** di BTK con maggior affinità rispetto ad altre chinasi, dovuta alle interazioni che instaura con il **residuo gatekeeper di treonina** in posizione **474**. Questo è un aspetto importante, in quanto solo il **10%** delle chinasi umane possiede la treonina come residuo gatekeeper; ciò consente di aumentare considerevolmente la selettività di Evobrutinib conseguentemente di ridurre

gli effetti collaterali “**off-target**” che potrebbe causare interagendo con altri enzimi. In modelli murini di lupus eritematoso sistemico e artrite reumatoide, il farmaco ha mostrato una solida efficacia clinica e istologica agendo sulle cellule B e sulle cellule dell'immunità innata.⁴²

Nell'**encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE)** Evobrutinib ha dimostrato di inibire l'attivazione e la maturazione dei linfociti B innescata dalla presentazione dell'antigene, oltre a compromettere anche la loro capacità di fungere da APC per i linfociti T. Anche il rilascio di citochine pro-infiammatorie è stato ridotto dall'azione del farmaco, contribuendo all'effetto finale di riduzione dell'infiltrazione di cellule nel SNC e dell'infiammazione correlata, portando ad un miglioramento clinico della patologia.⁵²

Il meccanismo centrale di Evobrutinib che inibisce l'attivazione dei linfociti T alleviando l'infiammazione a livello centrale è condiviso anche dagli anticorpi **monoclonali anti-CD20**, i quali però si sono dimostrati **più efficaci** rispetto all'inibitore di BTK; a tal proposito, sono emersi dati che hanno permesso di confrontare gli effetti dei due tipi di farmaci. In particolare, uno **studio di fase II con Rituximab** ha mostrato come il farmaco abbia provocato una cancellazione sostanziosa e quasi immediata dell'infiammazione all'interno del SNC, rilevata già quattro settimane dopo la prima dose e con un effetto marcato sulle ricadute; al contrario, una sola dose di Evobrutinib ha ottenuto una riduzione significativa delle lesioni alla risonanza magnetica solo nel range tra la settimana 12 e la settimana 24. Di conseguenza, rispetto ad Evobrutinib, le evidenze indicano che gli anticorpi anti-CD20 esercitano un livello di controllo della patologia non raggiunto dall'inibitore di chinasi.⁴²

In uno studio di fase II, in doppio cieco, 267 adulti con sclerosi multipla recidivante-remittente attiva o secondariamente progressiva con ricadute sono stati assegnati in modo casuale per 24

settimane a uno dei cinque gruppi di trattamento: Evobrutinib 25 mg una volta al giorno, Evobrutinib 75 mg una volta al giorno, Evobrutinib 75 mg due volte al giorno, placebo o Dimetilfumarato 240 mg due volte al giorno. Alla settimana 25, i pazienti che avevano ricevuto placebo sono passati a Evobrutinib 25 mg una volta al giorno per altre 24 settimane, mentre quelli che già ricevevano Evobrutinib o Dimetilfumarato hanno continuato a ricevere il trattamento originariamente assegnato.⁵³ L'end point primario era il numero cumulativo di lesioni registrate nella risonanza magnetica alle settimane 12, 16, 20 e 24; gli end point secondari erano rappresentati dalla variazione della frequenza di ricadute annuali e del punteggio EDSS, oltre che dalla sicurezza del farmaco.⁴²

I pazienti con RRMS che hanno ricevuto 75 mg di Evobrutinib una volta al giorno hanno presentato un numero significativamente inferiore di lesioni a 12 e 24 settimane di distanza, rispetto a quelli che avevano ricevuto placebo. Non ci sono state differenze significative nel tasso annualizzato di ricadute (ARR) o di progressione della disabilità con qualunque dose. Nel gruppo che assumeva Evobrutinib 75 mg due volte al giorno non è stata rilevata alcuna efficacia.⁵²

Per quanto riguarda gli **eventi avversi**, le dosi più elevate del farmaco (75 mg una volta e 75 mg due volte al giorno) sono state associate a una maggiore frequenza di innalzamento di enzimi quali **alanina aminotransferasi**, **aspartato aminotransferasi** e **lipasi**, con conseguente interruzione dello studio in alcuni pazienti. Non sono state segnalate aritmie cardiache, emorragie o ipertensione, spesso riscontrate con l'inibitore irreversibile **Ibrutinib**.

Attualmente, Evobrutinib è in fase di sperimentazione in due **studi** identici di **fase III** sulla sclerosi multipla recidivante, Evolution 1 e 2, con 930 pazienti ciascuno.⁴²

9.14 Tolebrutinib

Tra gli inibitori della tirosina-chinasi di Bruton in sperimentazione, Tolebrutinib è particolarmente interessante, in quanto gli studi in corso stanno testando il farmaco non solo nella sclerosi multipla recidivante-remittente (RRMS) per la quale sono già presenti diverse terapie in commercio, ma anche nelle due forme progressive della patologia, primaria (PPMS) e secondaria (SPMS).

Tolebrutinib è un inibitore irreversibile e ha dimostrato di ridurre la severità della patologia nel modello animale di **encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE)**, bloccando l'attivazione dei linfociti B mediata dal recettore BCR e quella delle cellule della microglia attraverso i recettori Fc.⁴⁵

Il farmaco è in grado di legarsi covalentemente alla **cisteina-481** nel dominio di BTK, come tutti gli inibitori irreversibili già analizzati in precedenza. Dopo somministrazione orale, riesce

attraversare la barriera emato-encefalica (**BEE**), inibendo così BTK sia a livello periferico che nel sistema nervoso centrale; ciò impedisce l'attivazione della via di trasduzione del segnale del recettore BCR dei linfociti B e la conseguente reazione immunitaria che porta a neuroinfiammazione e neurodegenerazione, dando inizio alla patogenesi della sclerosi multipla.

42

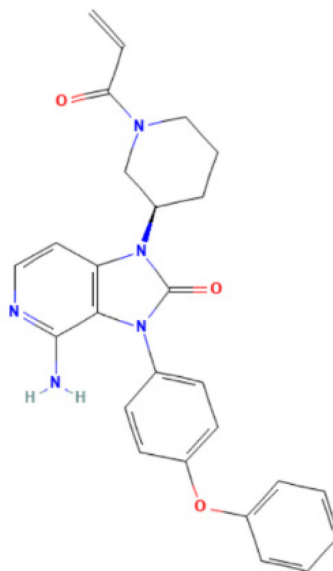


Figura 58: Struttura chimica di Tolebrutinib

Studi completati su Tolebrutinib

Un primo **studio di fase I** su volontari umani sani ha esplorato la sicurezza, i livelli di inibizione di BTK e la farmacocinetica di Tolebrutinib, compresa la capacità di penetrare all'interno della barriera emato-encefalica, analizzando la presenza della molecola nel liquido cerebrospinale.

In questo studio sono stati arruolati individui divisi in tre gruppi, ai quali sono state assegnate diverse dosi orali di farmaco: **5 mg, 7,5 mg, 15 mg, 30 mg, 60 mg, 90 mg**, fino a raggiungere i **120 mg** nel gruppo in cui è stata misurata la capacità penetrazione nel SNC. Tolebrutinib è stato somministrato come formulazione liquida orale o come placebo e tutte le dosi sono state somministrate a digiuno, se non diversamente specificato. Sono state effettuate frequenti misurazioni della farmacocinetica, dell'occupazione del recettore BTK e della sicurezza, con l'obiettivo di consentire la selezione delle dosi da somministrare negli studi terapeutici futuri.

Tolebrutinib è stato in generale ben tollerato con tutte le dosi somministrate; gli eventi avversi emergenti correlati al trattamento sono stati lievi, con solo diarrea e cefalea che sono state registrate in circa il **10%** dei partecipanti. L'inibitore irreversibile è stato rapidamente assorbito

dopo la somministrazione orale, registrando un'emivita rapida pari a circa **2 ore**. Le valutazioni hanno dimostrato un'occupazione estesa e prolungata di BTK già a partire dalla dose di 7,5 mg. Nel gruppo trattato con la dose di 120 mg è stata inoltre dimostrata la capacità penetrativa di Tolebrutinib, poiché dopo **2 ore** dalla somministrazione era evidente la presenza della molecola nel liquido cerebrospinale. I risultati dello studio di fase I hanno permesso di continuare la ricerca e sviluppare uno studio di fase II che potesse focalizzarsi sul range di dose ideale, al fine di esplorare gli esiti clinici nei pazienti affetti da sclerosi multipla.⁵⁶

Dopo i risultati conseguiti da Tolebrutinib nello studio di fase I, tra maggio 2019 e gennaio 2020 è stato condotto uno **studio di fase II** che ha valutato efficacia e sicurezza del farmaco nella **RRMS** e nella **SPMS** con ricadute. Come obiettivo primario c'era la determinazione della risposta dose-dipendente analizzando le nuove lesioni attive nel cervello, tramite risonanza magnetica. In particolare, sono state osservate le nuove lesioni a livello del SNC dopo **12 settimane** di trattamento con Tolebrutinib, confrontandole con quelle rilevate 4 settimane prima.

Lo studio, randomizzato e in doppio cieco, utilizzando placebo come controllo, ha suddiviso i partecipanti in due gruppi: in entrambi, i soggetti sono stati equamente distribuiti in altri 4 sottogruppi, ciascuno dei quali è stato sottoposto alla somministrazione di una dose di farmaco tra 4 disponibili (**5 mg, 15 mg, 30 mg, 60 mg**).

I partecipanti del primo gruppo, ciascuno assegnato alla propria dose, hanno assunto Tolebrutinib per 12 settimane, per poi concludere le ultime 4 settimane di studio assumendo placebo. Il secondo gruppo ha fatto il contrario, assumendo placebo per le prime 4 settimane e per le restanti 12 Tolebrutinib.⁵⁷

Estensione dello studio di fase IIb

I pazienti che hanno completato la fase in doppio cieco dello studio di fase IIb hanno avuto la possibilità arruolarsi in uno **studio di estensione** della sicurezza a lungo termine, della durata di **72 settimane**. Questi pazienti hanno inizialmente continuato a ricevere la stessa dose di Tolebrutinib che avevano ricevuto nello studio di ricerca in doppio cieco; successivamente, tutti hanno cominciato ad assumere Tolebrutinib **60 mg** al giorno. Alla settimana 72, nell'**84,7%** dei pazienti non sono state registrate nuove ricadute, e anche i **punteggi EDSS** sono rimasti stabili nei primi 18 mesi dello studio di sicurezza a lungo termine. Dopo **18 mesi**, i dati hanno continuato a mostrare una tollerabilità favorevole, senza far emergere nuove reazioni avverse al farmaco.⁵³

Efficacia

I risultati dello studio di fase IIb sul Tolebrutinib hanno mostrato una riduzione dose-dipendente del numero di lesioni: la dose del farmaco da **60 mg** ha determinato una riduzione dell'**85%** nella formazione di nuove lesioni rispetto al placebo, mentre il **90%** dei pazienti trattati con la stessa dose non ha registrato nuove lesioni dopo **12 settimane**. Durante le **4 settimane** in cui è stato somministrato placebo, non è stata riscontrata la formazione di nuove lesioni nel **75%** dei pazienti.⁵³

Con la risonanza magnetica che si utilizza per esaminare l'attività della sclerosi multipla possono essere identificate lesioni di tipo T1 o T2: le prime danno informazioni più accurate sull'attività della malattia ed evidenziano le aree di infiammazione attiva; le seconde permettono di effettuare una stima generale dell'infiammazione all'interno del sistema nervoso centrale, definendo il carico totale di lesioni.⁵⁸ Lo studio di fase IIb ha riscontrato una relazione dose-risposta anche per il numero di lesioni **T2**: la somministrazione di **60 mg** ha infatti determinato una riduzione dell'**89%** del numero di lesioni T2 nuove rispetto al placebo.⁵³

Sicurezza

Tra tutti i gruppi reclutati per lo studio, il **54%** dei pazienti ha manifestato eventi avversi, ma la loro comparsa non è stata dose-dipendente. Gli episodi più frequenti durante il trattamento con Tolebrutinib sono stati **cefalea (7%)**, **infezione del tratto respiratorio superiore (5%)** e **nasofaringite (4%)**. Tre pazienti hanno presentato livelli elevati di **enzimi epatici**, di cui due (uno nel gruppo Tolebrutinib 30 mg e l'altro nel gruppo da 60 mg) con concentrazioni di **alanina aminotransferasi** più che triplicate rispetto al limite superiore della norma. L'unico evento avverso grave è stato riportato in un paziente che riceveva la dose di **60 mg** del farmaco, il quale ha sviluppato una **severa recidiva di sclerosi multipla**; tuttavia, il trattamento non è stato interrotto e il paziente si è ripreso completando lo studio. Nessun soggetto ha quindi interrotto il trattamento o si è ritirato dallo studio a causa di un evento avverso.⁵³

Penetrazione all'interno della BEE

Uno degli ostacoli più complicati da superare nella ricerca di nuovi trattamenti per la sclerosi multipla è rappresentato dalla difficoltà di oltrepassare la **BEE** della maggior parte dei farmaci impiegati nella patologia. La barriera infatti, essendo molto selettiva, permette il passaggio di pochissime molecole, tra cui i linfociti B e T che contribuiscono allo sviluppo dell'infiammazione a livello centrale. Trovare dei composti in grado di superarla e di poter così esercitare il proprio

effetto direttamente all'origine della neurodegenerazione rappresenterebbe una svolta nella terapia, e potrebbe aprire nuove strade per la sintesi di altri farmaci. Nel contesto della SM, la penetrazione cerebrale è quindi una proprietà chiave degli inibitori di BTK; in uno studio condotto su scimmie i dati hanno indicato che queste molecole hanno una capacità penetrativa diversa nel sistema nervoso centrale. È emerso infatti che Tolebrutinib, pur avendo una minor selettività verso BTK rispetto ad Evobrutinib o Fenebrutinib, risulta essere il più efficace nel passaggio della BEE; le concentrazioni nel liquido cerebrospinale hanno superato l'IC₉₀ stimato, mentre né Fenebrutinib né Evobrutinib hanno raggiunto livelli di esposizione al liquido che si avvicinano al loro valore IC₉₀.⁴⁵

Attualità

Tolebrutinib è attualmente prodotto dall'azienda **Sanofi**, che nel 2020 ha avviato il reclutamento dei partecipanti a 4 **studi di fase III** in corso nel trattamento di RRMS, PPMS e SPMS:

- **Gemini 1 e 2:** sono due studi randomizzati e in doppio cieco, con **900** partecipanti ciascuno; l'obiettivo primario è la valutazione dell'efficacia di Tolebrutinib in somministrazione giornaliera rispetto a **14 mg di Teriflunomide** (Aubagio), misurata in base al tasso di ricadute annualizzato (**ARR**), in soggetti con sclerosi multipla recidivante-remittente. I partecipanti saranno assegnati in maniera casuale alla somministrazione di Tolebrutinib o Aubagio in rapporto **1:1**. Gli obiettivi secondari dello studio includono l'efficacia di Tolebrutinib sulla progressione della disabilità, sulle lesioni misurate tramite risonanza magnetica e sulla qualità generale di vita dei pazienti, oltre che su farmacocinetica e farmacodinamica della molecola. Le date stimate per il completamento dei due studi sono comprese tra agosto e settembre 2023.^{59,60}
- **Perseus:** questo studio ha come obiettivo primario la determinazione dell'efficacia di Tolebrutinib rispetto al placebo nel ritardare la progressione della disabilità nella sclerosi multipla primariamente progressiva (**PPMS**). Gli endpoints secondari sono la valutazione delle lesioni da risonanza magnetica, della farmacocinetica e farmacodinamica di Tolebrutinib in relazione con l'efficacia e la sicurezza del farmaco. Ai **990** partecipanti verranno assegnati in modo casuale Tolebrutinib o **placebo**, con due terzi dei soggetti che assumeranno il farmaco e i restanti rappresenteranno il gruppo di controllo. Si stima che ad agosto 2024 lo studio sarà terminato.⁶¹
- **Hercules:** l'attuale reclutamento per questo studio prevede **1131** partecipanti, ai quali saranno assegnati in modo casuale Tolebrutinib o **placebo** in rapporto **2:1**. L'obiettivo primario dello studio è valutare l'efficacia e la sicurezza di Tolebrutinib nel ritardare la progressione della disabilità in persone con **sclerosi multipla secondariamente**

progressiva, mentre gli endpoints secondari riguardano il numero di lesioni da risonanza magnetica, la farmacocinetica e la farmacodinamica della molecola. Agosto 2024 è il periodo stimato di completamento dello studio.⁶²

Nel giugno 2022 la **Food and Drug Administration** ha sospeso temporaneamente gli studi clinici di fase III su Tolebrutinib, a causa di **lesioni a livello epatico** in alcuni pazienti che avevano ricevuto il farmaco. È importante però ricordare che la maggior parte dei soggetti colpiti aveva una predisposizione storica agli effetti avversi epatici, i quali sono risultati reversibili con la cessazione della somministrazione del farmaco.

Lo studio **URSA** che stava analizzando Tolebrutinib come trattamento per la **miastenia grave** (un'altra patologia autoimmune) è stato definitivamente abbandonato da Sanofi, anche a causa della presenza di altre molecole in studio per il trattamento della patologia.

Ad oggi gli studi su Tolebrutinib per il trattamento della sclerosi multipla stanno proseguendo mediante attento monitoraggio della sicurezza del farmaco e aggiornamento dei protocolli di sperimentazione.⁴⁵

10. CONCLUSIONI

Sebbene sia conosciuta da anni e siano stati condotti numerosi studi che l'hanno analizzata nel dettaglio, la sclerosi multipla rimane ancora oggi una patologia autoimmune non totalmente compresa, in quanto sia le cause che la provocano sia i processi infiammatori correlati al suo sviluppo non sono del tutto chiari. Grandi passi avanti sono stati fatti nella scoperta di DMTs che potessero di fatto attenuare la reazione immunitaria incontrollata, permettendo di rallentare significativamente la progressione della disabilità e migliorando considerevolmente la qualità di vita dei pazienti.

Purtroppo, una terapia che possa definitivamente curare una persona con sclerosi multipla non è ancora stata scoperta, ma la ricerca non si ferma e cerca sempre di individuare nuove molecole compatibili con i disturbi autoimmuni. Gli inibitori di BTK ne sono un esempio, in quanto gli studi effettuati su queste molecole sono stati promettenti e fanno ben sperare per il futuro. La loro capacità, essendo molecole piccole, di oltrepassare la BEE, viene vista come grande vantaggio per il trattamento della SM; le dimensioni degli anticorpi monoclonali utilizzati per ottenere la deplezione dei linfociti B impediscono loro di accumularsi a livello centrale, e neanche iniezioni dirette nel liquido cerebrospinale risultano efficaci, in quanto i farmaci vengono rapidamente espulsi dal SNC. Ecco quindi che la capacità penetrativa di molecole come Tolebrutinib è una delle caratteristiche più ricercate negli studi di fase III in corso, anche perché gli inibitori di BTK sembrano non solo prevenire ulteriori danni riducendo i processi infiammatori a livello centrale, ma possono anche promuovere meccanismi di riparazione della mielina. Solo ulteriori studi potranno verificare ulteriormente questa ipotesi.

Un aspetto importante da prendere in considerazione sarà la valutazione degli effetti a lungo termine di questi inibitori; si sta parlando di molecole in grado di impedire la maturazione e la differenziazione dei linfociti B, cellule indispensabili per un corretto funzionamento del sistema immunitario. La valutazione dovrà incentrarsi sui potenziali cambiamenti dei livelli di anticorpi circolanti che gli inibitori di BTK possono provocare con l'utilizzo cronico, considerando che questi livelli sono sempre correlati alla dose di agente farmacologico che viene somministrata nel corso della vita. Fino ad ora i risultati sulla sicurezza delle molecole sono stati rassicuranti, con eventi avversi comuni reversibili e non particolarmente gravi.

Infine, l'efficace effetto clinico registrato, insieme al rapido ripristino delle funzionalità fisiologiche raggiunto dopo la cessazione della terapia, rende gli inibitori di BTK candidati ideali per un approccio terapeutico sequenziale, in associazione con farmaci che causano la deplezione dei linfociti B. Proprio per questo nei tumori maligni a cellule B alcuni inibitori vengono utilizzati in combinazione con Rituximab, risultando in un'associazione avente grande efficacia terapeutica. Tuttavia, gli approcci terapeutici sequenziali non sono attualmente esplorati nel

campo delle terapie per la SM, così come non sono in corso studi che mettano a confronto tra loro i diversi inibitori.

Tolebrutinib e gli altri inibitori di BTK rimangono una promettente terapia nel trattamento delle patologie autoimmuni come la SM; i progressi farmacologici assieme ai dati raccolti nel tempo forniranno risposte concrete sull'importante ruolo che queste potenti molecole potranno svolgere in futuro.

APPENDICE

MS/SM: Multiple sclerosis/sclerosi multipla

EBV: Epstein Barr Virus

SNC: Sistema nervoso centrale

BTK: Bruton's tyrosine kinase

BBB/BEE: Blood-brain barrier/barriera emato-encefalica

RNA: Acido ribonucleico

TLR: Toll-like receptor

BCR: B-cell receptor

TCR: T-cell receptor

IgA, IgE, IgG, IgM, IgD: Immunoglobuline

Fab: Antigen-binding fragments

Fc: Fragment crystallizable region

NK: Natural killer

IL-1: Interleuchina-1

Th1, Th2, Th17: Tipi di linfociti T-helper

IFN- γ : Interferone gamma

TNF- α : Tumor necrosis factor

IL-4, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, IL-26, IL-1 β , IL-10, CCL22, IL-6

APC: Antigen presenting cell

MHC: Major histocompatibility complex

CD8: Cluster of differentiation 8

CD4: Cluster of differentiation 4

SNP: Sistema nervoso periferico

OPC: Oligodendrocyte progenitor cell

ROS: Reactive oxygen species

M1: Fenotipo 1 di cellule della microglia

M2: Fenotipo 2 di cellule della microglia

IGF-1: Insuline-like growth factor

FGF-2: Fibroblast growth factor

CD28: Cluster of differentiation 28

CTLA4: Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4

HHV-6: Human herpesvirus 6
HLA-DRB*51: allele del MHC di classe II
NF- κ B: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
CIS: Clinically isolated syndrome
RRMS: Relapsing-remitting multiple sclerosis
SPMS: Secondary progressive multiple sclerosis
PPMS: Primary progressive multiple sclerosis
DMTs: Disease-modulatory therapies
EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis
IFN- β : Interferone- β
DMF: Dimetilfumarato
NrF2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PML: Progressive multifocal leukoencephalopathy
 α 4 β 1: Integrina very late antigen-4
S1PRs: Sphingosine-1-phosphate receptors
EMA: European medicines agency
ARR: Annualized relapse rate
CD52: Cluster of differentiation 52
CD20: Cluster of differentiation 20
DHFR: Diidrofolato reduttasi
ATP: Adenosina trifosfato
STK: Serin-treonin chinasi
TK: Tirosin-chinasi
RTK: Receptor tyrosine kinases
NRTK: Non-receptor tyrosine kinases
AxK: motivo delle protein-chinasi
DFG: Asp-Phe-Gly motif
APE: Motivo protein-chinasi
Xid: X-chromosome-linked immunodeficiency
TEC: Tyrosine kinase espressa in hepatocellular carcinoma
ITK: Interleukin-2-inducibile T cell kinase
RLK: Resting lymphocyte kinase

BMX: Bone marrow expressed kinase
PH: Pleckstrin homology
TH: Tec homology
PRR: Proline-rich region
SH2: Src homology 2 domain
SH3: Src homology 3 domain
CD72: Cluster of differentiation 72
CD3: Cluster of differentiation 3
Src: Famiglia di protein-chinasi non recettoriali
PI3-K: Fosfatidilinositolo-3-chinasi
PIP3: Fosfatidilinositolo-trifosfato
PKC: Protein-chinasi C
BRDG1: BCR downstream-signaling protein 1
Dok-1: Docking protein 1
PLC: Fosfolipasi C
Bcl-xL: Proteina antiapoptotica
XLA: X-linked Agammaglobulinemia
Fc γ R: Recettore Fc γ
RNS: Reactive nitrogen species
Ig- α /Ig- β o CD79A/CD79B: Dimero di proteine transmembrana del recettore BCR
ITAM: Immunoreceptor tyrosine based activation motifs
ITIM: Immunoreceptor tyrosine based inhibition motifs
SYK: Spleen tyrosine kinase
LYN: Tirosin-chinasi Lyn
BCAP: B-cell adapter
CD19: Cluster of differentiation 19
SLP65/BLNK: B-cell linker
CIN85: SH3 domain-containing kinase-binding protein 1
PLC γ 2: Fosfolipasi C γ 2
IP3: Inositolo-trifosfato
DAG: Diacilglicerolo
NFAT: Nuclear factor of activated T-cells

PKC β : Protein-chinasi C β
MAPK: Mitogen-associated protein kinase
AKT/PKB: Protein-chinasi B
TLR2: Toll-like receptor 2
TLR3: Toll-like receptor 3
TLR4: Toll-like receptor 4
TLR7/8: Toll-like receptor 7/8
TLR9: Toll-like receptor 9
MYD88: Myeloid differentiation primary response gene
IRAK1: Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
MAL: Myelin and lymphocyte protein
CXCR4: C-X-C Motif Chemokine Receptor 4
CXCR5: C-X-C Motif Chemokine Receptor 5
Fc γ RIIB: Recettore Fc RIIB inibitorio
SHIP: SH2 domain containing inositol polyphosphate 5'phospatase-1
SHP1: SH2 domain containing protein tyrosine phospatase-1
CLL: Chronic Lymphocytic Leukemia
EGFR: Epidermal growth factor receptor
IC50: Half maximal inhibitory concentration
EC50: Half maximal effective concentration
MOG35-55: Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein 35-55
EDSS: Expanded disability status scale

BIBLIOGRAFIA DELLE IMMAGINI

1. <https://www.my-personaltrainer.it/fisiologia/leucociti.html>
2. Università degli Studi di Trieste, https://moodle2.units.it/pluginfile.php/552828/mod_resource/content/0/02-%20Immunita%CC%80%20Innata.pdf immunità innata e adattativa
3. [https://it.wikipedia.org/wiki/Linfocita_NK#/media/File:Human_Natural_Killer_Cell_\(29120480442\).jpg](https://it.wikipedia.org/wiki/Linfocita_NK#/media/File:Human_Natural_Killer_Cell_(29120480442).jpg)
4. Università degli Studi Tor Vergata, corso di Immunologia e Immunopatologia, “Maturazione dei Linfociti T” <https://didattica.uniroma2.it/files/scarica/insegnamento/185645-Immunologia-E-Immunopatologia/69284-12.-Maturazione-Linfociti-T>
5. Keizer RJ et al. Clin Pharmacokin 2010; 49:493-507
6. Nicola Ferri, Università degli Studi di Padova, corso di “Farmacologia generale e farmacognosia”, 2020/2021
7. Università degli Studi Tor Vergata, corso di Immunologia e Immunopatologia, “Maturazione dei Linfociti T” <https://didattica.uniroma2.it/files/scarica/insegnamento/185645-Immunologia-E-Immunopatologia/69284-12.-Maturazione-Linfociti-T>
8. Università degli Studi di Trieste, Lezione “Attivazione linfociti T e immunità cellulo-mediata” https://moodle2.units.it/pluginfile.php/391536/mod_resource/content/1/LEZIONE%2012%20attivazione%20T.pdf
9. ISS Antonio Scarpa, Motta di Livenza (TV), Progetto Bioetica, “Risposta cellulare o cellulo-mediata” https://bioeticaliceoscarpa.altervista.org/progetto_bioetica/percorso-quinte/vaccini/il-sistema-immunitario/immunita-acquisita-specifica/risposta-mirata-allantigene/risposta-cellulare-cellulo-mediata/?doing_wp_cron=1687687607.3305299282073974609375
10. ISS Antonio Scarpa, Motta di Livenza (TV), Progetto Bioetica, “Risposta cellulare o cellulo-mediata” https://bioeticaliceoscarpa.altervista.org/progetto_bioetica/percorso-quinte/vaccini/il-sistema-immunitario/immunita-acquisita-specifica/risposta-mirata-allantigene/risposta-cellulare-cellulo-mediata/?doing_wp_cron=1687687607.3305299282073974609375
11. Università Politecnica delle Marche, “Sistema nervoso centrale (SNC) e sistema nervoso periferico (SNP)”, https://www.univpm.it/Entra/Engine/RAServeFile.php/f/P003415/allegati_doc/cenni_SISTEMA_NERVOSO.pdf

12. Prof. Aram Megighian, Università degli Studi di Padova, Fisiologia per Farmacia 2022, Lezione 6 “La sinapsi”
https://elearning.unipd.it/dsf/pluginfile.php/88025/mod_resource/content/1/LEZIONE_6.pdf
13. Focus, Scienza Salute, 2002, “Che cosa sono le sinapsi?”
<https://www.focus.it/scienza/salute/che-cosa-sono-le-sinapsi>
14. AISM, 2015, “Come si forma la mielina? Se ne è parlato a ECTRIMS con una ricerca targata AISM”,
https://www.aism.it/come_si_forma_la_mielina_se_ne_%C3%A8_parlato_ectrims_con_un_ricerca_targata_aism
15. <https://anatomiaumana.ch/>
16. Luo C, Jian C, Liao Y, Huang Q, Wu Y, Liu X, Zou D, Wu Y. The role of microglia in multiple sclerosis. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2017 Jun 26;13:1661-1667. doi: 10.2147/NDT.S140634. PMID: 28721047; PMCID: PMC5499932.
17. Höftberger, R., Lassmann, H., Berger, T. *et al.* Pathogenic autoantibodies in multiple sclerosis — from a simple idea to a complex concept. *Nat Rev Neurol* **18**, 681–688 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00700-2>
18. Shah A, Panchal V, Patel K, Alimohamed Z, Kaka N, Sethi Y, Patel N. Pathogenesis and management of multiple sclerosis revisited. *Dis Mon.* 2022 Oct 21:101497. doi: 10.1016/j.disamonth.2022.101497. Epub ahead of print. PMID: 36280474.
19. Shah A, Panchal V, Patel K, Alimohamed Z, Kaka N, Sethi Y, Patel N. Pathogenesis and management of multiple sclerosis revisited. *Dis Mon.* 2022 Oct 21:101497. doi: 10.1016/j.disamonth.2022.101497. Epub ahead of print. PMID: 36280474.
20. Shah A, Panchal V, Patel K, Alimohamed Z, Kaka N, Sethi Y, Patel N. Pathogenesis and management of multiple sclerosis revisited. *Dis Mon.* 2022 Oct 21:101497. doi: 10.1016/j.disamonth.2022.101497. Epub ahead of print. PMID: 36280474.
21. San Domenico Microchirurgia, Patologie del nervo ottico, Neuriti ottiche,
<https://www.sandomeniconline.it/patologie/neuriti-ottiche-patologie-del-nervo-ottico/>
22. Paola Botte, Melarossa, Salute, Ptologie, 2021, “Diplopia monoculare e binoculare: che cos’è, cause, tipi, sintomi, diagnosi e cure”,
<https://www.melarossa.it/salute/patologie/diplopia/>
23. C. Tilikete, Nistagmo, EMC – Neurologia, Volume 19, Issue 1, 2019, Pages 1-12, ISSN 1634-7072, [https://doi.org/10.1016/S1634-7072\(18\)41585-1](https://doi.org/10.1016/S1634-7072(18)41585-1)
24. <https://it.wikipedia.org/wiki/Metilprednisolone>
25. Martin R, Sospedra M, Rosito M, Engelhardt B, “Current multiple sclerosis treatments have improved our understanding of MS autoimmune pathogenesis”, *Eur J Immunol.* 2016 Sep;46(9):2078-90. doi: 10.1002/eji.201646485. PMID: 27467894

26. Piehl F., “Current and emerging disease-modulatory therapies and treatment targets for multiple sclerosis”, *J Intern Med.* 2021 Jun;289(6):771-791. doi: 10.1111/joim.13215. Epub 2020 Dec 20. PMID: 33258193; PMCID: PMC8246813
27. MIMS, 2023, <https://www.mims.com/hongkong/image/info/betaferon%20pre-filled%20syringe%208%20miu/0-25%20mg-ml?id=1c23885e-6162-45d8-9580-9fab010a02b4>
28. YPSOMED Selfcare Solutions, 2019, “Teva launches Copaxone with the Ypsomate autoinjector from Ypsomed” <https://www.ypsomed.com/it-IT/comunicati-stampa/notizia/teva-launches-copaxone-with-the-ypsomate-autoinjector-from-ypsomed.html>
29. PubChem, Teriflunomide, 1.1 2D Structure, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Teriflunomide>
30. PubChem, Dimethyl Fumarate, 1.1 2D Structure, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dimethyl-fumarate#section=2D-Structure>
31. Patricia Inacio, Multiple Sclerosis News Today, “Vumerity Approved in US as Treatment for RRMS and Active SPMS”
32. Andrea Huwiler, Uwe Zangemeister-Wittke, “The sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod as a therapeutic agent: Recent findings and new perspectives”, *Pharmacology & Therapeutics*, Volume 185, 2018, Pages 34-49, ISSN 0163-7258, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.11.001>
33. Andrea Huwiler, Uwe Zangemeister-Wittke, “The sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod as a therapeutic agent: Recent findings and new perspectives”, *Pharmacology & Therapeutics*, Volume 185, 2018, Pages 34-49, ISSN 0163-7258, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.11.001>
34. Michelle Llamas, Drugwatch, 2022, <https://www.drugwatch.com/lemtrada/>
35. Florou, D.; Katsara, M.; Feehan, J.; Dardiotis, E.; Apostolopoulos, V. Anti-CD20 Agents for Multiple Sclerosis: Spotlight on Ocrelizumab and Ofatumumab. *Brain Sci.* **2020**, *10*, 758. <https://doi.org/10.3390/brainsci10100758>
36. PubChem, Cladribine, 1.1 2D Structure, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cladribine>
37. Adriana Chilin, Università degli Studi di Padova, corso di “Chimica Farmaceutica e Tossicologica 1”, 2019/2020
38. Adriana Chilin, Università degli Studi di Padova, corso di “Chimica Farmaceutica e Tossicologica 1”, 2019/2020
39. Susan S. Taylor, Alexandr P. Kornev, Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins, *Trends in Biochemical Sciences*, Volume 36, Issue 2, 2011, Pages 65-77, ISSN 0968-0004, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.09.006>

40. Susan S. Taylor, Alexandr P. Kornev, Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins, *Trends in Biochemical Sciences*, Volume 36, Issue 2, 2011, Pages 65-77, ISSN 0968-0004, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.09.006>
41. Susan S. Taylor, Alexandr P. Kornev, Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins, *Trends in Biochemical Sciences*, Volume 36, Issue 2, 2011, Pages 65-77, ISSN 0968-0004, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.09.006>
42. Susan S. Taylor, Alexandr P. Kornev, Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins, *Trends in Biochemical Sciences*, Volume 36, Issue 2, 2011, Pages 65-77, ISSN 0968-0004, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.09.006>
43. Pal Singh S, Dammeijer F, Hendriks RW, “Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies”, *Mol Cancer*. 2018 Feb 19;17(1):57, doi: 10.1186/s12943-018-0779-z. Erratum in: *Mol Cancer*. 2019 Apr 3;18(1):79, PMID: 29455639; PMCID: PMC5817726
44. Mano H., “Tec family of protein-tyrosine kinases: an overview of their structure and function” *Cytokine Growth Factor Rev*. 1999 Sep-Dec;10(3-4):267-80, doi: 10.1016/s1359-6101(99)00019-2, PMID: 10647781
45. Mano H., “Tec family of protein-tyrosine kinases: an overview of their structure and function” *Cytokine Growth Factor Rev*. 1999 Sep-Dec;10(3-4):267-80, doi: 10.1016/s1359-6101(99)00019-2, PMID: 10647781
46. Najmi, A.; Thangavel, N.; Mohanan, A.T.; Qadri, M.; Albratty, M.; Ashraf, S.E.; Saleh, S.F.; Nayeem, M.; Mohan, S. Structural Complementarity of Bruton’s Tyrosine Kinase and Its Inhibitors for Implication in B-Cell Malignancies and Autoimmune Diseases. *Pharmaceuticals* 2023, 16, 400. <https://doi.org/10.3390/ph16030400>
47. García-Merino A., “Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors: A New Generation of Promising Agents for Multiple Sclerosis Therapy”, *Cells*. 2021 Sep 27;10(10):2560. doi: 10.3390/cells10102560. PMID: 34685540; PMCID: PMC8534278
48. Garg N, Padron EJ, Rammohan KW, Goodman CF, “Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors: The Next Frontier of B-Cell-Targeted Therapies for Cancer, Autoimmune Disorders, and Multiple Sclerosis”, *J Clin Med*. 2022 Oct 18;11(20):6139, doi: 10.3390/jcm11206139, PMID: 36294458; PMCID: PMC9604914
49. https://it.wikipedia.org/wiki/Recettore_delle_cellule_B
50. García-Merino A., “Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors: A New Generation of Promising Agents for Multiple Sclerosis Therapy”, *Cells*. 2021 Sep 27;10(10):2560. doi: 10.3390/cells10102560. PMID: 34685540; PMCID: PMC8534278
51. Pal Singh S, Dammeijer F, Hendriks RW, “Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies”, *Mol Cancer*. 2018 Feb 19;17(1):57, doi: 10.1186/s12943-018-0779-

- z. Erratum in: *Mol Cancer*. 2019 Apr 3;18(1):79, PMID: 29455639; PMCID: PMC5817726
52. Pal Singh S, Dammeijer F, Hendriks RW, “Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies”, *Mol Cancer*. 2018 Feb 19;17(1):57, doi: 10.1186/s12943-018-0779-z. Erratum in: *Mol Cancer*. 2019 Apr 3;18(1):79, PMID: 29455639; PMCID: PMC5817726
53. Pal Singh S, Dammeijer F, Hendriks RW, “Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies”, *Mol Cancer*. 2018 Feb 19;17(1):57, doi: 10.1186/s12943-018-0779-z. Erratum in: *Mol Cancer*. 2019 Apr 3;18(1):79, PMID: 29455639; PMCID: PMC5817726
54. Geladaris A, Torke S, Weber MS, “Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors in Multiple Sclerosis: Pioneering the Path Towards Treatment of Progression?” *CNS Drugs*. 2022 Oct;36(10):1019-1030, doi: 10.1007/s40263-022-00951-z. Epub 2022 Sep 30, PMID: 36178589; PMCID: PMC9550714
55. Najmi, A.; Thangavel, N.; Mohanan, A.T.; Qadri, M.; Albratty, M.; Ashraf, S.E.; Saleh, S.F.; Nayeem, M.; Mohan, S. Structural Complementarity of Bruton's Tyrosine Kinase and Its Inhibitors for Implication in B-Cell Malignancies and Autoimmune Diseases. *Pharmaceuticals* 2023, 16, 400. <https://doi.org/10.3390/ph16030400>
56. Najmi, A.; Thangavel, N.; Mohanan, A.T.; Qadri, M.; Albratty, M.; Ashraf, S.E.; Saleh, S.F.; Nayeem, M.; Mohan, S. Structural Complementarity of Bruton's Tyrosine Kinase and Its Inhibitors for Implication in B-Cell Malignancies and Autoimmune Diseases. *Pharmaceuticals* 2023, 16, 400. <https://doi.org/10.3390/ph16030400>
57. PubChem, Evobrutinib, 1.1 2D Structure, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Evobrutinib#section=2D-Structure>
58. PubChem, Tolebrutinib, 1.1 2D Structure, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Evobrutinib#section=2D-Structure>

BIBLIOGRAFIA

1. A. Shah, V. Panchal and K. Patel et al., “Pathogenesis and management of multiple sclerosis revisited”, *Disease-a-Month*, <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2022.101497>
2. https://www.aism.it/sclerosi_multipla_cosa_e_una_ricaduta_trattamenti
3. Chun Luo, Chongdong Jian, Yuhua Liao, Qi Huang, Yuejuan Wu, Xixia Liu, Donghua Zou, Yuan Wu, “The role of microglia in multiple sclerosis” <http://dx.doi.org/10.2147/NDT.S140634>
4. Giuseppe Anastasi, Silvano Capitani, Maria L. Carnazza, Saverio Cinti, Ottavio Cremona, Raffaele De Caro, Rosario F. Donato, Virgilio F. Ferrario, Luciano Fonzi, Adriano T. Franzi, Eugenio Gaudio, Raffaele Geremia, Giovanni Giordano Lanza, Carlo E. Grossi, Massimo Gulisano, Francesco A. Manzoli, Giovanni Mazzotti, Fabrizio Michetti, Sebastiano Miscia, Vincenzo Mitolo, Andrea Montella, Giovanni Orlandini, Antonio Paparelli, Tindaro Renda, Domenico Ribatti, Alessandro Ruggeri, Paola Sirigu, Antonio Soscia, Giovanni Tredici, Marco Vitale, Damiano Zaccheo, Giorgio Zauli, Sandra Zecchi, “Trattato di Anatomia umana – Volume terzo (4^a ed.)”, ISBN 88-7051-287-8
5. N. Joan Abbott, Adjanie A.K. Patabendige, Diana E.M., Dolman, Siti R. Yusof, David J. Begley, “Structure and function of the blood-brain barrier”, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
6. https://www.aism.it/vitamina_d_e_sclerosi_multipla
7. https://www.aism.it/sclerosi_multipla_forme#sm-pp
8. Brenner P., & Piehl F. (2016), “Fatigue and depression in multiple sclerosis: pharmacological and non-pharmacological interventions”. *Acta Neurologica Scandinavica*, 134 (Suppl 200), 47-54
9. https://www.aism.it/sintomi_della_sclerosi_multipla_la_fatica
10. Colombo B., & Comi G. (2004), “La gestione del paziente con sclerosi multipla: la fatica e il dolore”, *Neurological Sciences*, 25, S443-S449
11. https://www.aism.it/sintomi_della_sclerosi_multipla_dolore
12. Izquierdo G. (2017), “Multiple sclerosis symptoms and spasticity management: new data”, *Neurodegenerative Disease Management*, 7(6S), <https://doi.org/10.2217/nmt-2017-0034>
13. M. P. Barnes, R. M. Kent, J. K. Semlyen, K. M. McMullen, “Spasticity in Multiple sclerosis” <https://doi.org/10.1177/0888439002250449>
14. Fiona Costello, Department of Clinical Neurosciences & Department of Surgery, University of Calgary, Hotchkiss Brain Institute, Foothills Medical Centre, MS Clinic,

- Clinical Neurosciences, Calgary, Alberta Semin Neurol 2016; 36(02): 185-195, DOI: 10.1055/s-0036-1579692
15. Jana Midelfart Hoff, Mauran Dhayalan, Anna Midelfart, Ane Roushan Tharaldsen, Lars Bø, “Visual dysfunction in multiple sclerosis”, doi:10.4045/tidsskr.18.0786
 16. Ghezzi, A., & Zaffaroni, M. (2013), “Conoscere la Sclerosi Multipla. Guida pratica per i pazienti ed i familiari”, Roma: CIC Edizioni internazionali
 17. https://www.aism.it/sintomi_della_sclerosi_multipla_disturbi_della_sensibilita
 18. Mohammad Sajjad Rahnama’i, Multiple Sclerosis Journal, “Neuromodulation for functional bladder disorders in patients with multiple sclerosis”, 2020, Vol. 26(11) 1274–1280, <https://doi.org/10.1177/1352458519894714>
 19. Kalsi, V., Fowler, C., “Therapy Insight: bladder dysfunction associated with multiple sclerosis”. *Nat Rev Urol* 2, 492–501 (2005) <https://doi.org/10.1038/ncpuro0323>
 20. Karen L. Andrews M.D., Douglas A. Husmann M.D., “Bladder Dysfunction and Management in Multiple Sclerosis”
 21. Gil Moreno, M.J., Cerezo Garcia, M., Marasescu, R., Pinel González, A., Lòpez Alvarez, L., & Benito, A. (2013), “Neuropsychological syndrome in Multiple Sclerosis. *Psicothema*”, 25(4), 452-460
 22. Oreja-Guevara Celia, Ayuso Blanco Teresa, Brieva Ruiz Luis, Hernández Pérez Miguel Ángel, Meca-Lallana Virginia, Ramió-Torrentà Lluís, *Frontiers in Neurology* (2019) “Cognitive Dysfunctions and Assessments in Multiple Sclerosis”
 23. Giannopoulos, V., Kitsos, D., Tsogka, A. et al. Sexual dysfunction therapeutic approaches in patients with multiple sclerosis: a systematic review. *Neurol Sci* 44, 873–880 (2023). <https://doi.org/10.1007/s10072-022-06572-0>
 24. Marinetto, S.; Riccardi, A.; Barbadoro, F.; Pucci, V.; Selini, E.; Pavan, A.; Rinaldi, F.; Perini, P.; Puthenparampil, M.; Gallo, P.; Mondini, S. Sexual Dysfunction in Multiple Sclerosis: The Role of Executive Function. *Behav. Sci.* 2023, 13, 369. <https://doi.org/10.3390/bs13050369>
 25. Ashizawa T, Xia G. Ataxia. *Continuum (Minneap Minn)*. 2016 Aug;22(4 Movement Disorders):1208-26, doi: 10.1212/CON.0000000000000362. PMID: 27495205; PMCID: PMC5567218
 26. https://www.aism.it/sintomi_della_sclerosi_multipla_depressione
 27. https://www.aism.it/sintomi_della_sclerosi_multipla_disturbi_intestinali
 28. Martin R, Sospedra M, Rosito M, Engelhardt B, “Current multiple sclerosis treatments have improved our understanding of MS autoimmune pathogenesis”, *Eur J Immunol*. 2016 Sep;46(9):2078-90. doi: 10.1002/eji.201646485. PMID: 27467894

29. Piehl F., “Current and emerging disease-modulatory therapies and treatment targets for multiple sclerosis”, *J Intern Med.* 2021 Jun;289(6):771-791. doi: 10.1111/joim.13215. Epub 2020 Dec 20. PMID: 33258193; PMCID: PMC8246813
30. https://www.aism.it/terapie_sclerosi_multipla_alemtuzumab_lemtrada
31. Martinelli Boneschi F, Vacchi L, Rovaris M, Capra R, Comi G, “Mitoxantrone for multiple sclerosis”, *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013, Issue 5. Art. No.: CD002127. DOI: 10.1002/14651858.CD002127.pub3. Accessed 11 June 2023
32. Franz Felix Konen, Nora Möhn, Torsten Witte, Matthias Schefzyk, Miriam Wiestler, Svjetlana Lovric, Karsten Hufendiek, Philipp Schwenkenbecher, Kurt-Wolfram Sühs, Manuel A. Friese, Luisa Klotz, Refik Pul, Marc Pawlitzki, David Hagin, Christoph Kleinschnitz, Sven G. Meuth, Thomas Skripuletz, “Treatment of autoimmunity: The impact of disease-modifying therapies in multiple sclerosis and comorbid autoimmune disorders”, *Autoimmunity Reviews*, Volume 22, Issue 5, 2023, 103312, ISSN 1568-9972, <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2023.103312>
33. <https://www.aifa.gov.it/accesso-precoce-uso-off-label>
34. https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_006515_015628_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113
35. MSIF ms international federation, “Treatments and therapies”
36. Casetta I, Iuliano G, Filippini G, “Azathioprine for multiple sclerosis”, *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007, Issue 4, Art. No.: CD003982, DOI: 10.1002/14651858.CD003982.pub2
37. Salzer J, Svenningsson R, Alping P, Novakova L, Björck A, Fink K, Islam-Jakobsson P, Malmeström C, Axelsson M, Vågberg M, Sundström P, Lycke J, Piehl F, Svenningsson A., “Rituximab in multiple sclerosis: A retrospective observational study on safety and efficacy”, *Neurology.* 2016 Nov 15;87(20):2074-2081. doi: 10.1212/WNL.0000000000003331. Epub 2016 Oct 19. PMID: 27760868; PMCID: PMC5109942
38. Dobson, R. and Giovannoni, G. (2019), “Multiple sclerosis – a review”, *Eur J Neurol*, 26: 27-40. <https://doi.org/10.1111/ene.13819>
39. Sara Cheek, Hong Zhang, Nick V Grishin, Sequence and Structure Classification of Kinases, *Journal of Molecular Biology*, Volume 320, Issue 4, 2002, Pages 855-881, ISSN 0022-2836, [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00538-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00538-7)
40. Susan S. Taylor, Alexandr P. Kornev, Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins, *Trends in Biochemical Sciences*, Volume 36, Issue 2, 2011, Pages 65-77, ISSN 0968-0004, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.09.006>
41. Torke S, Pretzsch R, Häusler D, Haselmayer P, Grenningloh R, Boschert U, Brück W, Weber MS, “Inhibition of Bruton's tyrosine kinase interferes with pathogenic B-cell

- development in inflammatory CNS demyelinating disease”, *Acta Neuropathol.* 2020 Oct;140(4):535-548, doi: 10.1007/s00401-020-02204-z. Epub 2020 Aug 6. PMID: 32761407; PMCID: PMC7498502
42. García-Merino A., “Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors: A New Generation of Promising Agents for Multiple Sclerosis Therapy”, *Cells.* 2021 Sep 27;10(10):2560. doi: 10.3390/cells10102560. PMID: 34685540; PMCID: PMC8534278
43. Mano H., “Tec family of protein-tyrosine kinases: an overview of their structure and function” *Cytokine Growth Factor Rev.* 1999 Sep-Dec;10(3-4):267-80, doi: 10.1016/s1359-6101(99)00019-2, PMID: 10647781
44. Pal Singh S, Dammeijer F, Hendriks RW, “Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies”, *Mol Cancer.* 2018 Feb 19;17(1):57, doi: 10.1186/s12943-018-0779-z. Erratum in: *Mol Cancer.* 2019 Apr 3;18(1):79, PMID: 29455639; PMCID: PMC5817726
45. Geladaris A, Torke S, Weber MS, “Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors in Multiple Sclerosis: Pioneering the Path Towards Treatment of Progression?” *CNS Drugs.* 2022 Oct;36(10):1019-1030, doi: 10.1007/s40263-022-00951-z. Epub 2022 Sep 30, PMID: 36178589; PMCID: PMC9550714
46. Shirai T, Tanaka K, Terada Y, Sawada T, Shirai R, Hashimoto Y, Nagata S, Iwamatsu A, Okawa K, Li S, Hattori S, Mano H, Fukui Y, “Specific detection of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate binding proteins by the PIP3 analogue beads: an application for rapid purification of the PIP3 binding proteins”, *Biochim Biophys Acta.* 1998 Apr 24;1402(3):292-302, doi: 10.1016/s0167-4889(98)00014-7, PMID: 9606988
47. Yao L, Kawakami Y, Kawakami T. “The pleckstrin homology domain of Bruton tyrosine kinase interacts with protein kinase C”, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Sep 13;91(19):9175-9, doi: 10.1073/pnas.91.19.9175, PMID: 7522330; PMCID: PMC44770
48. Koytiger G, Kaushansky A, Gordus A, Rush J, Sorger PK, MacBeath G, “Phosphotyrosine signaling proteins that drive oncogenesis tend to be highly interconnected”, *Mol Cell Proteomics.* 2013 May;12(5):1204-13, doi: 10.1074/mcp.M112.025858, Epub 2013 Jan 28, PMID: 23358503; PMCID: PMC3650332
49. Ren S, Yang G, He Y, Wang Y, Li Y, Chen Z, “The conservation pattern of short linear motifs is highly correlated with the function of interacting protein domains”, *BMC Genomics.* 2008 Oct 1;9:452, doi: 10.1186/1471-2164-9-452, PMID: 18828911; PMCID: PMC2576256
50. Schneider R, Oh J, “Bruton's Tyrosine Kinase Inhibition in Multiple Sclerosis”, *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2022 Nov;22(11):721-734, doi: 10.1007/s11910-022-01229-z. Epub 2022 Oct 27, PMID: 36301434; PMCID: PMC9607648

51. Garg N, Padron EJ, Rammohan KW, Goodman CF, “Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors: The Next Frontier of B-Cell-Targeted Therapies for Cancer, Autoimmune Disorders, and Multiple Sclerosis”, *J Clin Med.* 2022 Oct 18;11(20):6139, doi: 10.3390/jcm11206139, PMID: 36294458; PMCID: PMC9604914
52. Edgar Carnero Contentti & Jorge Correale (2020) Bruton’s tyrosine kinase inhibitors: a promising emerging treatment option for multiple sclerosis, *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 25:4, 377-381, DOI: 10.1080/14728214.2020.1822817
53. Krämer, J., Bar-Or, A., Turner, T.J. et al. Bruton tyrosine kinase inhibitors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 19, 289–304 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41582-023-00800-7>
54. Najmi, A.; Thangavel, N.; Mohanan, A.T.; Qadri, M.; Albratty, M.; Ashraf, S.E.; Saleh, S.F.; Nayeem, M.; Mohan, S. Structural Complementarity of Bruton’s Tyrosine Kinase and Its Inhibitors for Implication in B-Cell Malignancies and Autoimmune Diseases. *Pharmaceuticals* 2023, 16, 400. <https://doi.org/10.3390/ph16030400>
55. Lindsey Shapiro, Multiple Sclerosis news today, a Bionews brand, “Orelabrutinib reduces brain lesions in RRMS by 90% in Phase 2 trial”, 2023, <https://multiplesclerosisnewstoday.com/news-posts/2023/03/29/orelabrutinib-reduces-rrms-brain-lesions-90-percent-trial-analysis/>
56. Owens TD, Smith PF, Redfern A, Xing Y, Shu J, Karr DE, Hartmann S, Francesco MR, Langrish CL, Nunn PA, Gourlay SG. Phase 1 clinical trial evaluating safety, exposure and pharmacodynamics of BTK inhibitor tolebrutinib (PRN2246, SAR442168). *Clin Transl Sci.* 2022 Feb;15(2):442-450. doi: 10.1111/cts.13162. Epub 2021 Nov 12. PMID: 34724345; PMCID: PMC8841436
57. Reich DS, Arnold DL, Vermersch P, Bar-Or A, Fox RJ, Matta A, Turner T, Wallström E, Zhang X, Mareš M, Khabirov FA, Traboulsee A; Tolebrutinib Phase 2b Study Group. Safety and efficacy of tolebrutinib, an oral brain-penetrant BTK inhibitor, in relapsing multiple sclerosis: a phase 2b, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 2021 Sep;20(9):729-738. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00237-4. PMID: 34418400; PMCID: PMC8434816
58. Fondazione I.R.C.C.S. Istituto Neurologico Carlo Besta, <https://www.istituto-besta.it/risonanza-magnetica-glossario>
59. A Phase 3, Randomized, Double-blind Efficacy and Safety Study Comparing SAR442168 to Teriflunomide (Aubagio®) in Participants With Relapsing Forms of Multiple Sclerosis (GEMINI 1); NCT04410978
60. A Phase 3, Randomized, Double-blind Efficacy and Safety Study Comparing SAR442168 to Teriflunomide (Aubagio®) in Participants With Relapsing Forms of Multiple Sclerosis (GEMINI 2); NCT04410991

61. A Phase 3, Randomized, Double-blind, Efficacy and Safety Study Comparing SAR442168 to Placebo in Participants With Primary Progressive Multiple Sclerosis (PERSEUS); NCT04458051
62. A Phase 3, Randomized, Double-blind, Efficacy and Safety Study Comparing SAR442168 to Placebo in Participants With Nonrelapsing Secondary Progressive Multiple Sclerosis (HERCULES)