



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA**

**TESI DI LAUREA**

**TERAPIA GENICA PER IL TRATTAMENTO  
DELL'IPERCOLESTEROLEMIA:  
FARMACOLOGIA CLINICA DI INCLISIRAN**

**RELATORE: CHIAR.MO PROF. NICOLA FERRI**

**LAUREANDA: CHIARA TONIN**

**ANNO ACCADEMICO 2021/2022**



## **INDICE**

INTRODUZIONE .....	1
1. IPERCOLESTEROLEMIA E ATEROSCLEROSI ASSOCIATA .....	4
1.1 Percorso dei lipidi all'interno dell'organismo umano .....	5
1.2 Sintesi del colesterolo endogeno .....	5
1.3 Dislipidemie .....	6
1.4 Aterosclerosi .....	7
1.5 Aterogenesi .....	8
1.6 Diagnosi della patologia aterosclerotica .....	11
1.7 Approcci terapeutici .....	13
2. PCSK9 .....	16
2.1 SKI-1/S1P .....	17
2.2 Biologia strutturale e cellulare di PCSK9 .....	17
2.3 Meccanismo d'azione di PCSK9 .....	19
2.4 Regolazione genica di PCSK9 .....	20
2.5 Modelli animali di PCSK9 .....	21
2.6 Relazione tra statine PCSK9 .....	21
2.7 Risultati clinici .....	22
2.8 Riduzione LDL sesso-dipendente .....	24
2.9 PCSK9 e patologie epatiche .....	25
2.10 Ruolo regolatorio di PCSK9 per Lp(a) .....	25
2.11 Ruolo di PCSK9 in infiammazione, sepsi e infezione virale .....	26
2.12 PCSK9 e parassiti .....	28
2.13 Ruoli di PCSK9 in altri organi .....	29
3. STRATEGIE TERAPEUTICHE ATTUALI: PRO E CONTRO .....	39
3.1 Integratori ad azione ipocolesterolemizzante .....	39
3.2 Resine sequestranti acidi biliari .....	46
3.3 Statine .....	47
3.4 Ezetimibe .....	49
3.5 Anticorpi monoclonali anti-PCSK9 .....	49
3.6 Aferesi .....	52
3.7 Oligonucleotidi antisenso .....	52
4. VERSO LA TERAPIA GENICA: INCLISIRAN .....	55
4.1 Terapia genica .....	57

4.2 Anti-ApoB .....	59
4.3 Anti-ANGPTL3.....	59
4.4 Inclisiran .....	60
5.CONCLUSIONI.....	69
APPENDICE .....	71
BIBLIOGRAFIA DELLE IMMAGINI .....	73
BIBLIOGRAFIA.....	75

## **INTRODUZIONE**

L'ipercolesterolemia è tra i principali fattori che concorrono allo sviluppo dell'aterosclerosi, tale deposito di colesterolo e agenti infiammatori nei vasi aumenta drasticamente il rischio di incorrere in eventi cardiovascolari. Infatti, l'accumulo di colesterolo a livello delle pareti di medio e grosso calibro, determina, dapprima, una parziale riduzione del lume causando eventi clinici quali l'angina stabile e, successivamente, la perforazione del cappuccio fibroso e la generazione dell'evento trombotico con conseguente occlusione vasale che determina l'infarto miocardico o l'ictus cerebrale.

Le patologie cardiovascolari sono la prima causa di morte al mondo e, proprio per questa gravante, nel corso degli anni si sono studiate varie strategie che rifornissero l'arsenale terapeutico disponibile, allo scopo di ottenere risultati clinici migliori e ridurre sempre di più gli effetti collaterali, le interazioni farmacologiche e le complicanze.

La seguente recensione si concentra, inizialmente, sulla descrizione dell'ipercolesterolemia, analizzando il ruolo fisiologico del colesterolo quale componente fondamentale delle membrane cellulari e patologico nello sviluppo della placca aterosclerotica. Successivamente pone l'attenzione sul legame esistente tra evoluzione dell'aterosclerosi e incidenza di eventi cardiovascolari, analizzando le cause biologiche principali. Prosegue con un'attenta ricerca delle funzioni svolte dalla proproteina convertasi subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), enzima coinvolto nella degradazione dei recettori per le lipoproteine a bassa densità (LDL) non solo nel distretto epatico, ma anche in altri siti dell'organismo. Termina, infine, passando in rassegna i vari protocolli terapeutici che sono al momento adottati nel trattamento dell'ipercolesterolemia.

Il primo intervento prevede un cambiamento dello stile di vita, favorendo l'attività fisica, andando a scoraggiare il consumo di bevande zuccherate che contribuiscono all'obesità e riducendo, se non completamente abolendo, il consumo di tabacco. In secondo luogo si applica la terapia farmacologica per cui sono numerosi le molecole che agendo su specifici target portano a buoni risultati clinici: iniziando dagli integratori fitoterapici, estratti di berberina, cinarina e, in particolar modo, quelli a base di riso rosso fermentato; per poi passare alle statine: agenti altamente efficaci nell'abbassamento delle LDL che reprimono anche l'infiammazione indipendentemente dagli effetti su lipidi, esse hanno rivoluzionato la prevenzione ed il trattamento dell'aterosclerosi trascinando con loro però effetti collaterali importanti tra cui mialgia e nei casi più gravi rabdomiolisi.

Oltre a questi ho analizzato altri approcci già noti e tradizionali tra cui resine sequestranti acidi biliari, ezetimibe ed aferesi, ma anche più innovativi quali anticorpi monoclonali e terapie geniche. L'identificazione di mutazioni in PCSK9 come causa dell'ipercolesterolemia, infatti, ha spinto la ricerca a sviluppare rapidamente la terapia anti-PCSK9 in grado di migliorare ulteriormente gli esiti cardiovascolari nei pazienti già trattati con statine. La protein chinasi conducendo il recettore per le LDL al lisosoma, dove subisce la degradazione proteolitica, porta ad una riduzione della densità recettoriale sulla superficie degli epatociti e decrementa l'internalizzazione di colesterolo. L'inibizione di PCSK9 favorisce, dunque, il riciclaggio dei recettori non degradati e la loro esposizione sulla superficie cellulare, riducendo i livelli di colesterolo nel plasma.

La mia trattazione pone il focus su un nuovo farmaco di recente approvazione: **Inclisiran**. Uno short interfering RNA (siRNA) appartenente alla grande famiglia delle terapie geniche. Esso, legandosi ad una sequenza nucleotidica specifica, promuove la degradazione della PCSK9 epatica garantendo un'ottima efficacia in termini di riduzione di LDL e fornendo una durata d'azione notevolmente lunga, tale per cui il regime posologico è stato stabilito con cadenza biennale. Il tropismo selettivamente epatico, inoltre, scongiura gli eventuali effetti avversi in altri distretti derivanti dall'azione di un generico inibitore totale della protein chinasi.

In questo percorso, partendo dagli integratori alimentari nutraceutici fino ad arrivare agli approcci più all'avanguardia nei casi di maggior resistenza, il mio intento è stato quello di fare un vero e proprio “viaggio nel tempo” delle terapie adottate nell'ipercolesterolemia, focalizzandomi su una promettente strategia farmacologica innovativa che ha ottenuto ottimi risultati in termini di sicurezza, efficacia e compliance da parte del paziente.

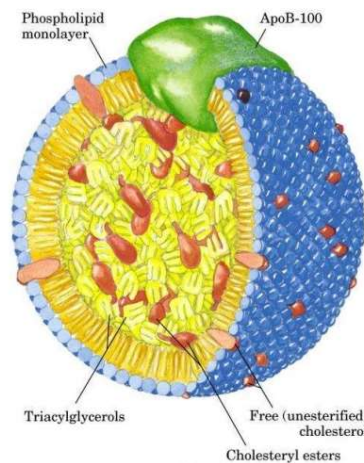


## **1. IPERCOLESTEROLEMIA E ATEROSCLEROSI ASSOCIATA**

Il colesterolo è una sostanza fondamentale per l'organismo umano: è precursore degli ormoni steroidei e degli acidi biliari indispensabili nell'assorbimento intestinale dei lipidi e delle vitamine liposolubili, è un componente essenziale delle membrane cellulari alle quali dona elasticità e flessibilità, risulta fondamentale anche per la corretta crescita del feto, ragion per cui la donna in stato di gravidanza non deve essere trattata con farmaci ipolipemizzanti per non creare danni al nascituro.

Tuttavia, un'alterata regolazione della sintesi, dell'assorbimento o dell'escrezione di colesterolo possono predisporre concentrazioni troppo elevate nel plasma che possono condurre all'insorgenza di malattie cardiovascolari di origine aterosclerotica anche molto gravi.

Il colesterolo è un composto insolubile nel sangue, deve quindi essere veicolato nel torrente ematico tramite dei vettori per impedirgli di precipitare. Tali carriers sono lipoproteine, ovvero particelle complesse ad alto peso molecolare con struttura globulare in cui il colesterolo idrofilo (con gruppi -OH in posizione '3), fosfolipidi e apoproteine formano l'involucro esterno entro cui vengono racchiusi lipidi apolari idrofobici come, ad esempio, esteri del colesterolo e trigliceridi, segregati dall'ambiente acquoso esterno (Figura 1).



*Figura 1. Rappresentazione di una lipoproteina*

Le apoproteine hanno vari ruoli tra cui rendere più idrofila la struttura della lipoproteina e il riconoscimento di recettori organo-specifici, ad esempio ApoE e ApoB si legano a recettori espressi nel fegato.

Esistono varie tipologie di lipoproteine:

1. HDL (High Density Lipoprotein)
2. LDL (Low Density Lipoprotein)
3. VLDL (Very Low Density Lipoprotein)
4. Chilomicroni

Si differenziano in base alla composizione, ovvero la quantità di colesterolo e trigliceridi che trasportano; per la dimensione, inversamente proporzionale alla densità e per la densità cioè il rapporto tra proteine e lipidi.

La quota di trigliceridi è inversamente proporzionale a quella di colesterolo: chilomicroni > VLDL > LDL > HDL.



## 1.1 Percorso dei lipidi all'interno dell'organismo umano

I **chilomicroni** sono le lipoproteine caratterizzate dalla minor densità e dal maggior diametro. Sono costituiti per la maggior parte da trigliceridi, i quali, una volta introdotti con la dieta, vengono captati a livello dell'intestino tenue e assieme ad una ridotta quota di colesterolo concorrono alla formazione di tali lipoproteine. Attraverso la circolazione sanguigna i chilomicroni raggiungono i capillari dei tessuti, perlopiù quello adiposo e muscolare, dove vengono sfruttati come fonte energetica liberando gli acidi grassi ottenuti dall'idrolisi dei TG tramite l'azione delle lipasi tissutali. In questo modo diventano particelle responsabili del trasporto del colesterolo alimentare al fegato. La quota di chilomicroni residua viene riconosciuta da strutture recettoriali epatiche, i cosiddetti recettori "remnant", grazie poi all'azione di specifiche lipasi che idrolizzano gli esteri del colesterolo derivanti dal chilomicrone remnant vengono poi assemblate le VLDL.

Le **VLDL** sono lipoproteine ad alto contenuto in trigliceridi, esse, dopo essere state sintetizzate nel fegato, hanno il compito di trasferire i TG ai tessuti mantenendo l'apporto lipidico costante nel tempo anche dopo il pasto. Una volta giunte a destinazione, le VLDL vengono idrolizzate in acidi grassi, cambiano composizione e diventano **LDL**, ovvero lipoproteine ad alto contenuto in colesterolo. Esse rappresentano la principale fonte di colesterolo per le cellule extraepatiche nelle quali svolge la funzione di stabilizzatore delle membrane o di precursore degli ormoni steroidei.

Infine, il colesterolo può rientrare dai tessuti al fegato trasportato dalle **HDL**, lipoproteine sintetizzate da fegato ed intestino in grado di legarsi alle LDL e di inglobare il colesterolo in eccesso. In tal modo le cellule epatiche potranno recuperarlo ed eliminarlo attraverso la bile. Un aspetto importante da sottolineare è che le HDL diminuiscono il ruolo aterogeno delle LDL, quest'ultime non sono aterogene e tossiche di per sé ma lo diventano dopo aver subito ossidazione.

## 1.2 Sintesi del colesterolo endogeno

Alla quota di colesterolo esogeno assunto con la dieta si affianca la porzione ricavata dalla sintesi endogena, che risulta essere quella maggiormente rilevante. Il colesterolo, infatti, viene sintetizzato negli epatociti a partire dall'Acetil-CoA (Figura 2).

Questa via biosintetica è inibita dalle statine, le quali bloccano a monte l'HMG-CoA reduttasi impedendo la formazione di Mevalonato ed arrestando la sintesi di colesterolo endogeno.

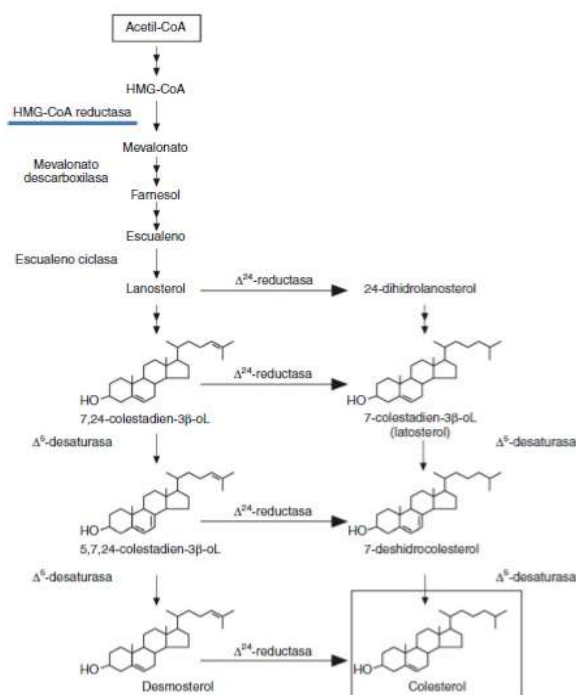


Figura 2. Via di formazione del colesterolo endogeno

Ci sono persone che a causa di polimorfismi genetici, pur avendo un'alimentazione controllata con basso apporto lipidico, hanno comunque livelli eccessivi di colesterolo nel sangue. Questo può essere dovuto ad una sovra-stimolazione della via dell'Acetil-CoA che conduce ad un aumento della sintesi; ad un incremento dell'attività di PCSK9 che degrada i recettori per le LDL oppure ad una intrinseca carenza di LDLR per cui l'epatocita non assimilando più il colesterolo necessario dalle lipoproteine sarà costretto a sintetizzarlo aumentando la concentrazione.

Classe	Valore mg/dl	Classificazione
Colesterolo totale	<200	desiderabile
	200-239	moderatamente alto
	>240	alto
Colesterolo LDL	<100	ottimale
	100-129	quasi ottimale
	130-159	moderatamente alto
	160-189	alto
Colesterolo HDL	>190	molto alto
	<40	basso
	>60	alto
Trigliceridi	>150	alto

*Figura 3. Schema dei valori lipidici plasmatici*

Più è alto il valore di HDL meglio è, in quanto rappresenta il cosiddetto “colesterolo buono”. E' il rapporto HDL/LDL ad essere rilevante in termini patologici, quindi, più elevato sarà HDL più alto sarà il valore di LDL che potrò accettare.

### **1.3 Dislipidemie**

Le dislipidemie costituiscono un gruppo di alterazioni del metabolismo lipidico che si manifestano con variazioni della concentrazione o con modifiche qualitative delle lipoproteine presenti nel plasma. Possono essere causate da un aumento del colesterolo, dei trigliceridi o di entrambi e possono derivare da una sintesi accelerata o da una ritardata degradazione delle lipoproteine plasmatiche.

Si possono distinguere iperlipidemie in cui aumentano sia i trigliceridi che il colesterolo LDL o iperlipemie dove ad aumentare è solo la quota di TG.

L'ipercolesterolemia è una iperlipidemia caratterizzata da elevati valori di LDL nel sangue, è fondamentale monitorarla e trattarla con farmaci ipolipidemizzanti perché porta ad un rilevante incremento del rischio cardiovascolare.

Può essere classificata in:

- **Primaria**, causata da alterazioni metaboliche ereditarie coinvolgenti uno o più geni attivi nel metabolismo lipoproteico, in particolare si può manifestare una diminuita espressione o addirittura assenza di recettori epatici per LDL.

Può essere di tipo familiare eterozigote con una ridotta espressione recettoriale e valori colesterolemici che oscillano tra i 280-500 mg/dL; oppure familiare omozigote con praticamente nessuna espressione dei recettori e valori superiori ai 1000 mg/dL. I pazienti in questione sono molto giovani, addirittura bambini e se non trattati vanno incontro a morte a 20-30 anni.

- **Secondaria**, dipendente dalla presenza di un'altra patologia concomitante che ha come conseguenza un'alterazione del metabolismo lipidico, come ad esempio l'ipotiroidismo, il diabete, l'insufficienza renale cronica. Anche l'utilizzo di farmaci o di altre sostanze esogene possono interferire sulle medesime vie metaboliche, ad esempio immunosoppressori e antiretrovirali.

#### **1.4 Aterosclerosi**

Negli ultimi decenni si è registrato un aumento delle patologie cardiache associate ad aterosclerosi, una condizione patologica caratterizzata da lesioni della parete delle arterie dovute a perdita di elasticità, accumulo di calcio, colesterolo e materiale fibrotico.

Il deposito di tali sostanze al di sotto dell'endotelio dell'arteriola causa lo sviluppo di vere e proprie placche denominate "ateromi". L'evoluzione della suddetta placca porta ad un graduale restringimento del lume dell'arteria e nei casi più gravi alla sua occlusione, provocando un'insufficiente irrorazione sanguigna e scompensi multipli.

The Global Burden of Disease Study, un vasto programma di ricerca globale sull'onere della malattia che valuta la mortalità e la disabilità a causa di importanti patologie, lesioni e fattori di rischio, mostra che la prevalenza mondiale della cardiopatia ischemica è passata da 100 milioni di casi nel 1990 a 180 milioni nel 2019.

Dalla review di Peter Libby "The changing landscape of atherosclerosis" si evince che l'incremento di LDL è diretta causa di aterosclerosi e ne vengono recensite le evidenze.<sup>1</sup>

Anzitutto è da chiarire che il rischio di sviluppare la patologia non è più concentrato nei Paesi occidentali e non vede più come paziente medio l'uomo bianco di mezza età, fumatore e con uno stile di vita poco sano. L'aterosclerosi è tra le prime cause della maggior parte dei decessi mondiali, colpendo una vasta gamma di popolazione di differenti etnie, età e sesso.

Si è assistito ad una transizione epidemiologica<sup>1</sup>: attraverso la vaccinazione, la maggior igiene ed il trattamento delle infezioni acute, si è ridotta la prevalenza di malattie trasmissibili; di contro però l'adozione di modelli dietetici meno sani ha contribuito al dilagare dell'aterosclerosi e delle sue conseguenze (infarto del miocardio, cardiomiopatia ischemica, ictus, malattia arteriosa periferica). Queste condizioni portano all'estensione della morbilità nel mondo in via di sviluppo, in modo che la mortalità giovanile risulta ridotta, ma aumenta il carico di patologie cardiovascolari croniche.

Ecco perché è fondamentale comprendere la genesi di questa malattia e sviluppare strategie per ridurre l'incidenza globale.

Come già accennato le cause primarie sono da ricercare nella genetica individuale, infatti, i punteggi di rischio genetico sono stati sottoposti a continui studi e si è visto che un numero sempre più ampio di varianti influenzano gli eventi aterosclerotici.

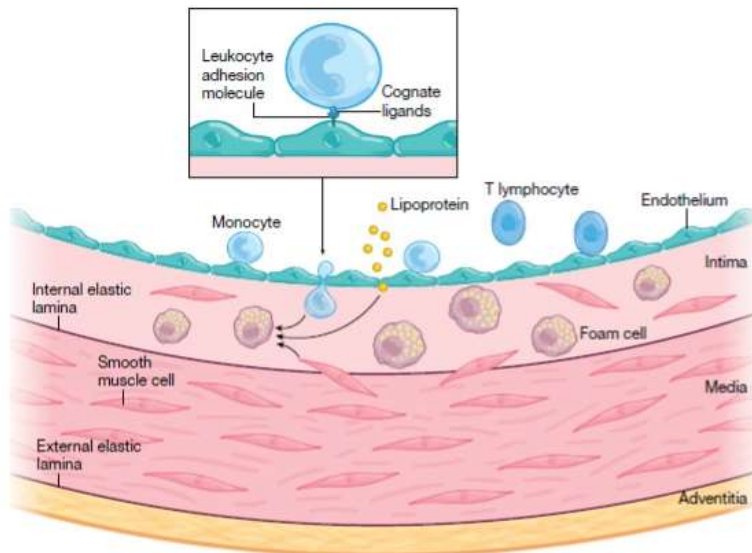
Fattori di rischio secondari sono invece uno stile di vita sedentario associato ad una dieta dall'alto introito lipidico che porta ad un incremento di LDL, elevata pressione sanguigna, fumo di sigaretta, patologie concomitanti, farmaci, ma anche inquinamento ambientale e disturbi del sonno hanno attirato l'attenzione.

Ad oggi esistono terapie efficaci per il trattamento della pressione alta, dei disordini lipidici e dell'ipercolesterolemia; tuttavia, la patologia aterosclerotica colpisce un numero sempre maggiore di persone ed in continuo aumento è anche l'incidenza tra i giovani, i quali con

L'avanzare dell'età porteranno ad accrescere ancora di più il carico di pazienti con patologie cardiache croniche.

Nonostante gli efficaci interventi permane quindi un rischio residuo considerevole di aterosclerosi.

### **1.5 Aterogenesi**



*Figura 4. Rappresentazione schematica della genesi di un ateroma.*

L'arteria normale comprende tre strati (Figura 4): l'intima più interna a stretto contatto con il flusso sanguigno, la tunica media e l'avventizia.

In condizioni omeostatiche, il monostrato endoteliale che riveste l'intima non raccoglie i leucociti del sangue. Quando però l'organismo viene attivato da citochine proinfiammatorie o altri stimoli irritativi, le cellule endoteliali possono esprimere una molecola di adesione (come VCAM-1) che interagisce con i suoi ligandi affini (VLA4) per promuovere il rotolamento ed eventualmente l'adesione dei monociti e linfociti del sangue allo strato endoteliale.

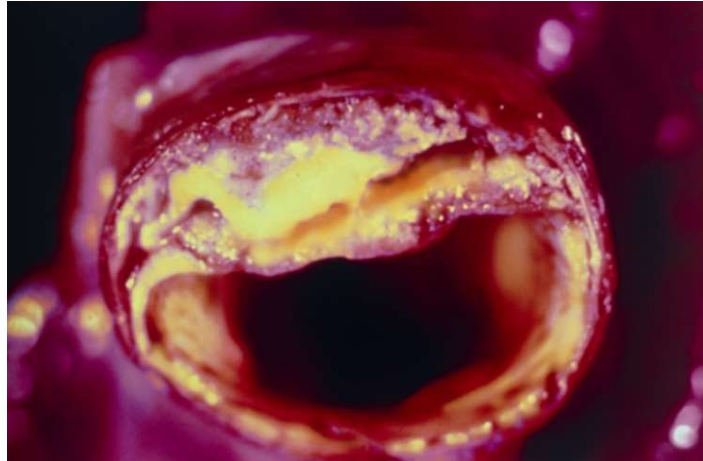
L'esito finale si concretizza con la loro migrazione verso lo spazio sottoendoteliale e l'avvio di una risposta infiammatoria vascolare locale.<sup>2</sup>

I lipidi circolanti, specialmente il colesterolo delle lipoproteine a bassa densità (LDL) ed il colesterolo delle lipoproteine a densità molto bassa (VLDL), si legano alle cellule endoteliali e vengono ossidati a livello subendoteliale, mentre i monociti si trasformano in macrofagi. La captazione dei lipidi ossidati e la trasformazione dei macrofagi in cellule schiumose ricche di lipidi, provocano le tipiche lesioni aterosclerotiche precoci dette "strie lipidiche". I macrofagi elaborano citochine proinfiammatorie, le quali reclutano cellule muscolari lisce migrate dalla media, attraggono i macrofagi e ne stimolano ulteriormente la crescita.

Ne risulta una placca fibrosa subendoteliale con cappuccio fibroso, costituita da cellule muscolari lisce intimali circondate da tessuto connettivo e lipidi intra ed extracellulari. Un processo simile alla formazione del tessuto osseo causa poi la calcificazione all'interno della placca.

La placca aterosclerotica (Figura 5) è il segno distintivo dell'aterosclerosi, è un'evoluzione della stria lipidica e dispone di 3 componenti principali:

- Lipidi
- Cellule muscolari infiammatorie e lisce
- Una matrice di tessuto connettivo che può contenere trombi in varie fasi di organizzazione e depositi di Ca



*Figura 5. Placca aterosclerotica*

Le placche aterosclerotiche possono essere **stabili** o **instabili**.

Le placche stabili possono regredire, non mutare o accrescere lentamente nell'arco di molti decenni fino a causare stenosi o occlusione.

Le placche instabili possono andare incontro ad erosione spontanea, fissurazione o rottura, causando trombosi acuta, occlusione e infarto molto prima di provocare stenosi emodinamicamente significativa.

La maggior parte degli eventi clinici deriva dalle placche instabili, che non sembrano di entità grave all'angiografia; pertanto, la stabilizzazione della placca può essere un modo per ridurre la morbilità e la mortalità.

La forza del cappuccio fibroso e la sua resistenza alla rottura dipendono dal precario equilibrio che si instaura tra deposizione e degradazione di collagene. La rottura della placca implica la secrezione di metalloproteinasi, catepsine e collagenasi da parte dei macrofagi attivati nella placca, questi enzimi digeriscono il cappuccio fibroso causandone l'assottigliamento fino alla rottura finale. Successivamente si ha secrezione di citochine, le quali inibiscono la sintesi e il deposito del collagene da parte delle cellule muscolari lisce che normalmente rinforza la placca.

Con la rottura della placca si verifica l'esposizione del contenuto al sangue circolante, dando inizio al processo trombotico. Inoltre, i macrofagi stimolano già di per sé la trombosi, in quanto contengono un fattore tissutale che favorisce la sintesi della trombina in vivo.

Si può verificare uno tra i seguenti cinque esiti:

- Il trombo può organizzarsi ed essere incorporato nella placca, modificandone la forma e causandone la rapida crescita.
- Il trombo può occludere rapidamente il lume vascolare e scatenare un evento ischemico acuto.
- Il trombo può embolizzare.

- La placca può riempirsi di sangue, rigonfiarsi come un palloncino ed occludere completamente l'arteria.
- Le sostanze contenute nella placca (piuttosto che il trombo) possono embolizzare, occludendo i vasi a valle.

La stabilità delle placche dipende da molti fattori, tra cui la composizione della placca (rapporto relativo di lipidi, cellule infiammatorie, cellule muscolari lisce, tessuto connettivo e trombo), lo stress parietale (indebolimento del cappuccio), la dimensione, la localizzazione del core e la morfologia della placca in relazione al flusso sanguigno. Contribuendo alla rapida crescita e alla deposizione lipidica, l'emorragia intraplacca può svolgere un ruolo importante nel trasformare una placca stabile in una placca instabile.

In generale, le placche coronariche instabili sono ricche di macrofagi, possiedono spesso un core lipidico e un cappuccio fibroso sottile; esse restringono il lume vascolare anche più del 50% e tendono alla rottura in modo imprevedibile.

Le placche instabili carotidee hanno un'analogia composizione, ma tipicamente le conseguenze ad esse riferibili sono dovute alla stenosi grave ed all'occlusione o alla deposizione di trombi piastrinici più che alla rottura.

Le placche a basso rischio di solito hanno un cappuccio e un minore contenuto lipidico, spesso restringono il lume vascolare <50% e possono provocare angina da sforzo stabile e prevedibile.

Oltre la dislipidemia, studi clinici indicano che anche l'infiammazione partecipa fondamentalmente all'aterogenesi e alla fisiopatologia degli eventi ischemici. È stato evidenziato un legame tra le concentrazioni di lipoproteine residue ed i livelli di proteina C-reattiva, un biomarcatore di infiammazione.<sup>2</sup> Indagini sperimentali hanno altresì individuato la partecipazione dell'immunità innata e adattativa nell'aterosclerosi.

Una recente evidenza nei topi indica che le cellule muscolari lisce possono andare incontro a metaplasia, e dare origine a cellule schiumose che presentano marcatori in comune con quelli dei macrofagi<sup>1</sup>.

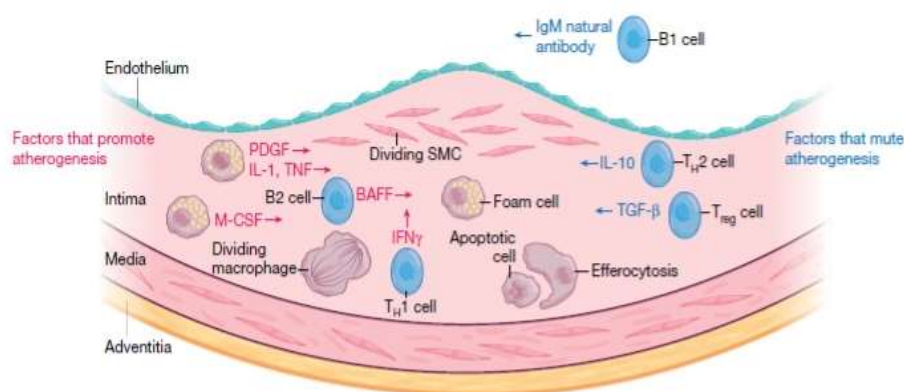


Figura 6. Fattori promotori e inibenti la formazione della placca aterosclerotica

Questo diagramma (Figura 6) riassume alcuni risultati ottenuti da studi sperimentali sui topi e osservazioni sull'uomo in tema di placche aterosclerotiche.

Si possono distinguere percorsi volti a promuovere la formazione di lesioni (fattori in rosso) mostrati a sinistra e meccanismi che possono moderare l'aterogenesi (fattori in blu) sulla destra.

PDGF promuove la replicazione delle cellule muscolari lisce e quindi la produzione di matrice extracellulare. Tutte le cellule della placca ateromatosa possono secernere citochine, come ad esempio IL-1, TNF e M-CSF. I linfociti T-helper 1 (TH1) attivati producono IFN $\gamma$ , che può stimolare la secrezione di fagociti mononucleati ed aggravare l'aterosclerosi.

I linfociti B1 possono secernere IgM.

I linfociti T-helper 2 (TH2) producono la citochina antinfiammatoria IL-10 e le cellule T regolatorie (Treg) possono secernere TGF $\beta$ .

Quest'ultimi mediatori possono antagonizzare la proliferazione cellulare, promuovere la sintesi della matrice extracellulare e sedare l'infiammazione. I fagociti mononucleati possono inghiottire le cellule morte che sorgono attraverso l'apoptosi, attraverso un processo noto come *efferocitosi*. L'efferocitosi inefficiente favorisce l'accumulo di detriti e promuove la formazione del nucleo lipidico centrale della placca aterosclerotica.

I linfociti B2 secernono mediatori (come BAFF, membro della famiglia dei TNF) che possono aggravare l'aterogenesi.

Questo diagramma mostra solo un sottoinsieme degli elementi che sono coinvolti nella promozione o nell'antagonismo dell'aterogenesi. La ricerca attuale suggerisce una continua lotta tra proliferazione e morte, che coinvolge mediatori proinfiammatori, antinfiammatori e pro-risolutivi.

Proprio per questo coinvolgimento è stata tentata la terapia antinfiammatoria, la quale ha prodotto una riduzione relativa del 15% del rischio di recidiva dell'infarto miocardico, ictus o morte cardiaca<sup>1</sup>.

Gli eventi acuti come infarti del miocardio e ictus ischemico derivano da trombosi o formazione di coaguli, spesso causati da un'interruzione fisica delle placche aterosclerotiche. Una frattura del cappuccio fibroso, infatti, espone il sangue e le proteine della coagulazione circolanti a sostanze trombogene presenti all'interno della placca, innescando una trombosi acuta.

## **1.6 Diagnosi della patologia aterosclerotica**

L'approccio alla diagnosi di aterosclerosi dipende dalla presenza o dall'assenza dei sintomi.

### **Pazienti sintomatici**

Nei pazienti che accusano sintomi riconducibili all'ischemia si valutano il grado e la sede dell'occlusione vascolare mediante vari test invasivi e non.

In questi soggetti devono essere valutati anche i fattori di rischio per l'aterosclerosi mediante:

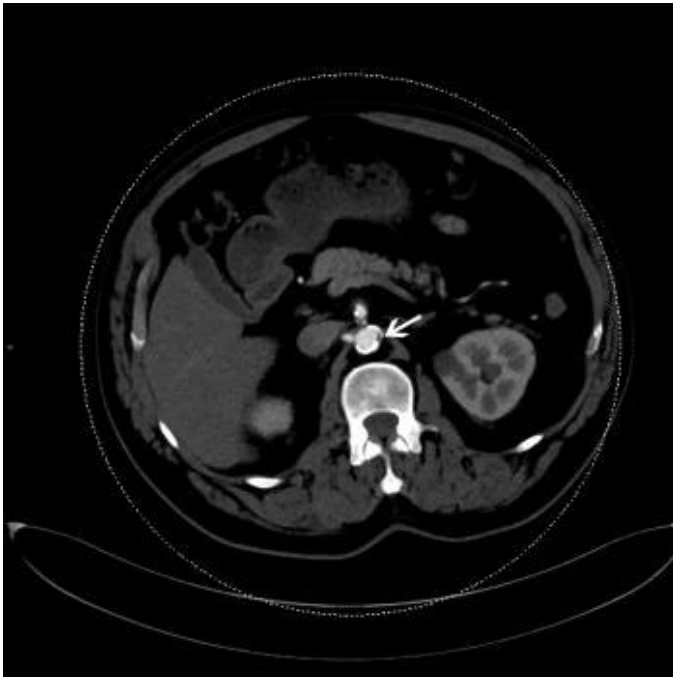
1. Anamnesi ed esame obiettivo
2. Profilo lipidico a digiuno
3. Livelli di glicemia e di emoglobina glicata (HbA1C)
4. Anche i marker sierici dell'infiammazione possono darci informazioni utili alla diagnosi. Livelli di proteina C-reattiva  $\geq 3,1\text{mg/dL}$  ( $\geq 29,5\text{ nmol/L}$ ) sono altamente predittivi di eventi cardiovascolari
5. Patologie concomitanti

Le tecniche non invasive di imaging che possono valutare la morfologia e le caratteristiche della placca comprendono:

- Ecografia vascolare tridimensionale
- Angiografia con tomografia computerizzata
- Angio-RM

Vengono anche utilizzati test invasivi catetere-guidati. Tra questi:

- Ecografia intravascolare, che utilizza un trasduttore ecografico sulla punta di un catetere per produrre immagini della parete e del lume dell'arteria.
- Angioscopia, che utilizza speciali cateteri a fibre ottiche in grado di visualizzare direttamente la superficie arteriosa.
- Termografia a placche, che si utilizza per rilevare l'aumento della temperatura nelle placche con infiammazione attiva.
- Tomografia a coerenza ottica, utilizza la luce laser a infrarossi per l'imaging.
- Elastografia, viene utilizzata per identificare placche morbide, ricche di lipidi.
- L'immunoscintigrafia è un'alternativa non invasiva che utilizza dei traccianti radioattivi che si localizzano nella placca a rischio di rottura.
- Lo studio della vascularizzazione tramite PET (positron emission tomography) è un altro approccio emergente per valutare una placca vulnerabile.



Questa scansione TC con contrasto mostra la placca aterosclerotica nell'aorta discendente (freccia).

*Figura 7. Scansione TC placca aterosclerotica*

### **Pazienti asintomatici**

Nei pazienti asintomatici la base è lo screening.

Nei soggetti con fattori di rischio per l'aterosclerosi ma asintomatici, il ruolo di altri test oltre il profilo lipidico non è chiaro. Sebbene ci si serva di diverse analisi per rilevare la placca aterosclerotica, tra cui l'ecografia carotidea per misurare lo spessore mediale intimale, non si è migliorato in modo affidabile il potere predittivo degli eventi ischemici.



Un'eccezione è rappresentata dall'imaging TC per il calcio coronarico, grazie alla quale si può ottenere uno score calcico che risulta invece importante per migliorare le stime di rischio, nella previsione di attacchi ischemici e per decidere la terapia in pazienti selezionati. (p. es., quelli con rischio intermedio, storia familiare di malattia cardiovascolare prematura).

La maggior parte delle linee guida raccomanda uno screening del profilo lipidico nei pazienti con una delle caratteristiche seguenti:

- Uomini  $\geq 40$  anni
- Donne  $\geq 50$  anni e in postmenopausa
- Diabete di tipo 2
- Anamnesi familiare di ipercolesterolemia familiare o malattia cardiovascolare prematura (ossia, età di insorgenza  $< 55$  anni nel parente di 1° grado maschile o  $< 65$  anni in parente di 1° grado femminile)
- Sindrome metabolica
- Ipertensione
- Condizioni infiammatorie croniche

Attualmente, l'American Heart Association (AHA) raccomanda l'utilizzo delle equazioni di valutazione del rischio di coorte globale per stimare la durata della vita ed il rischio nei successivi 10 anni in pazienti con una malattia cardiovascolare aterosclerotica. Questo calcolatore di rischio è basato su sesso, età, razza, livelli di colesterolo totale, HDL, pressione arteriosa sistolica, diabete e abitudine al fumo.<sup>2</sup>

### **1.7 Approcci terapeutici**

Il primo intervento nel controllo dell'evoluzione della patologia aterosclerotica prevede un cambiamento dello stile di vita: andando a favorire l'attività fisica, scoraggiare il consumo di bevande zuccherate che contribuiscono all'obesità e ridurre, se non completamente abolire, il consumo di tabacco.

In secondo luogo, si applica la terapia farmacologica. Ad oggi sono numerose le molecole che agendo su specifici target portano a buoni risultati. Si inizia dai fitoterapici, primi fra tutti gli integratori a base di riso rosso fermentato che hanno ottenuto largo consenso nella popolazione, per poi passare alle statine. Quest'ultimi agenti sono la prima scelta terapeutica in pazienti con ipercolesterolemia, hanno rivoluzionato la prevenzione ed il trattamento dell'aterosclerosi in quanto sono altamente efficaci nella riduzione delle LDL. Molte persone in terapia accusano, però, effetti collaterali importanti tra cui mialgia e nei casi più gravi rabdomiolisi.

L'identificazione di mutazioni di PCSK9 come causa dell'ipercolesterolemia ha portato ad un crescente ed imponente studio del meccanismo d'azione dell'enzima, sfociato poi nello sviluppo della terapia anti-PCSK9, la quale ha ottenuto risultati ottimi andando a migliorare ulteriormente gli esiti cardiovascolari nei pazienti già trattati con statine. La PCSK9 conduce il recettore delle LDL al lisosoma, dove subisce degradazione proteolitica. L'inibizione della protein chinasi attraverso anticorpi monoclonali favorisce il riciclaggio dei recettori per le LDL non degradati e la loro esposizione sulla superficie cellulare, dove possono captare e interiorizzare LDL e, quindi, abbassarne la concentrazione plasmatica.

La mia trattazione pone il focus su un nuovo farmaco: Inclisiran. Un piccolo RNA interferente che limita la produzione della PCSK9 epato-specifica, limitando così gli effetti collaterali derivanti dall'azione della protein chinasi in altri siti dell'organismo, fornendo una durata d'azione notevolmente lunga tale per cui potrebbe essere somministrato due volte l'anno o addirittura annualmente.



## 2.PCSK9

Nel genoma umano sono presenti 9 geni che codificano per altrettante proteine convertasi (“PC”), le quali condividono in parte la sequenza nucleotidica con una subtilisina batterica e in parte con una kexina del lievito (“PCSK”). Sono caratterizzate dalla presenza di un sito attivo in grado di catalizzare l'idrolisi enzimatica dei peptidi.

Sono responsabili del processamento proteolitico di proteine secrete, come ormoni, citochine, fattori di crescita, recettori e molecole di adesione.

Queste proteasi regolano funzioni cellulari essenziali e la loro alterazione può portare a sindrome metabolica, dislipidemia, infiammazione, cancro, ansia, depressione e una lunga serie di altri quadri patologici.

Di conseguenza molti studi clinici stanno analizzando i ruoli delle varie PC nelle malattie e un loro ipotetico utilizzo come bersaglio farmacologico.

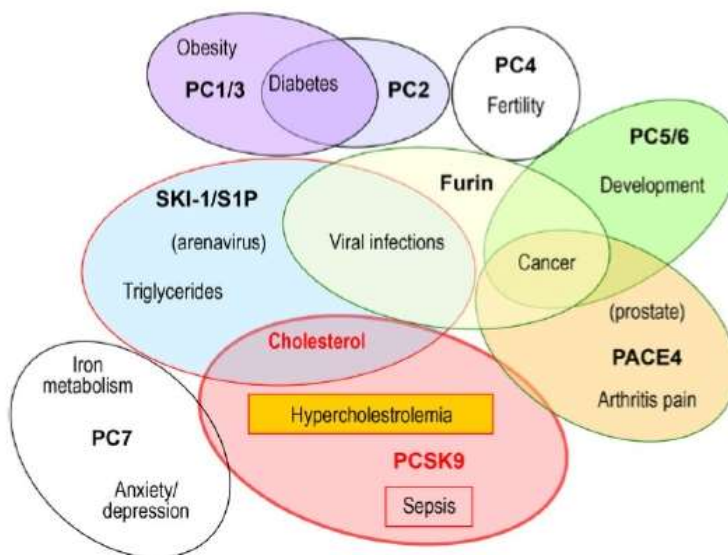


Figura 8. Tipologie di PC e rispettivi ambiti clinici

In figura 8 sono indicati i campi clinici in cui agisce ciascuna proteina convertasi.

Ad oggi, solo PCSK9 è clinicamente mirata nel trattamento dell'ipercolesterolemia tramite l'impiego di anticorpi monoclonali (mAbs).

In questo schema si nota che il diabete è correlato sia alla PC1/3 che alla PC2 attraverso l'elaborazione dell'insulina. I tumori sono regolati principalmente dalla furina, PC5/6 e PACE4 tramite l'elaborazione dei fattori di crescita e dei loro recettori. La maggior parte delle glicoproteine virali di superficie sono elaborate da furin e, in alcuni casi, da SKI-1/S1P. La sintesi di colesterolo e trigliceridi è regolata da SKI-1/S1P e PCSK9. La convertasi PC4 ha un ruolo nella fertilità, PC7 nel metabolismo del ferro e nell'ansia/depressione.

Infine, negli esseri umani, PC1/3, PC5/6 e PACE4 sono geneticamente legate rispettivamente all'obesità, ai difetti dello sviluppo e al dolore dell'osteoartrite.

Trattando l'ipercolesterolemia vediamo come agiscono in particolare **SKI-1/S1P** e **PCSK9**.

## **2.1 SKI-1/S1P**

La proteasi del sito 1 del fattore di trascrizione legato alla membrana o proteasi del sito 1 (S1P) in breve, nota anche come subtilisina/kexina-isoezima 1 (SKI-1), è un enzima che nell'uomo è codificato dal gene *Mbtps1*. Essa scinde un'ansa della proteina legante gli elementi regolatori degli steroli (SREBP) nel reticolo endoplasmatico.

Il gene *Mbtps1* codifica per SKI-1/S1P, questa proteina subisce un primo evento autocatalitico nel reticolo endoplasmatico (ER) per generare un eterodimero che esce dal reticolo e si dirige verso il Golgi cis/mediale dove si verifica un secondo evento autocatalitico e viene acquisita l'attività catalitica vera e propria.

Viene codificata una proteasi espressa in modo ubiquitario che regola l'omeostasi del colesterolo e dei lipidi attraverso la scissione dei substrati in residui non basici.

SKI-1/S1P è stata la prima protein chinasi implicata nella regolazione del metabolismo lipidico, con la sua inibizione la sintesi lipidica nel fegato era diminuita del 75%. Tuttavia, test murini di inattivazione completa del gene *Mbtps1* hanno condotto a morti embrionali precoci con mancata formazione di epiblasti, ostacolando così le applicazioni cliniche sull'uomo di inibitori di questa convertasi.<sup>3</sup>

## **2.2 Biologia strutturale e cellulare di PCSK9**

La PCSK9 è una serino-proteinasi costituita da 692 amminoacidi appartenente alla famiglia delle subtilisine e scoperta nel 2003. La sua abbondante espressione negli epatociti e la localizzazione del gene che la codifica (1p32) su una regione del cromosoma umano legata all'ipercolesterolemia familiare (FH) in alcune famiglie francesi del tempo, ha condotto i ricercatori a sospettare e presto confermare che tale gene rappresenta il terzo locus FH, assieme a quello del recettore delle LDL (LDLR) e dell'apolipoproteina B (ApoB).<sup>4</sup>

Proprio per questa ragione le analisi funzionali della proteina verterono su una sua possibile influenza circa il metabolismo delle lipoproteine a bassa densità.

La proteinasi condivide omologia di sequenza con molti vertebrati, tra cui scimpanzé, scimmia, topo, ratto, pesce, pollo, zebrafish e più di altre 40 specie.<sup>4</sup>

Il genoma bovino, ampiamente utilizzato in biologia cellulare, invece, mostra un arresto prematuro del codone dell'esone 10 codificante per la PCSK9, di conseguenza il siero bovino fetale non contiene la proteina e non può essere impiegato per i test.<sup>3</sup>

Inoltre, sebbene il gene di PCSK9 non si trovi nella maggior parte degli invertebrati, alcuni di loro esprimono comunque la proteina come il *Branshiostoma floridae*, un cefalocordato.

Come tutte le altre protein chinasi anche PCSK9 subisce una scissione autocatalitica dei suoi domini, ma la caratteristica più sorprendente e fondamentale che la contraddistingue dalle altre PC, è la sua incapacità di liberarsi dal prodominio, il quale rimane ancorato alla proteina occupandone il sito attivo impedendole in questo modo di interagire con i substrati.

Nelle altre PC il prodominio funge da chaperone intramolecolare e potente inibitore transitorio. Successivamente alla scissione autocatalitica questo viene perso e si genera la proteasi attiva; in PCSK9, invece, il prodominio rimane legato in modo non covalente alla tasca catalitica ostacolando così qualsiasi attività dell'enzima e portando alla secrezione di un complesso inattivo.

Pertanto, mentre le altre PC possono scindere e attivare/inattivare i precursori delle proteine secretorie, PCSK9 si limita a legare vari recettori e accompagnarli agli endosomi/lisosomi per la degradazione.

In figura 9.A è riportata una rappresentazione schematica di proPCSK9 e della sua forma elaborata, la quale rimane legata in modo non covalente al prodominio.

Il precursore subisce un clivaggio autocatalitico nel reticolo endoplasmatico, come descritto in precedenza il proPCSK9 non può uscire da questo compartimento e non può rilasciare l'enzima maturo fino a quando non viene scissa una specifica sequenza intramolecolare:

Val-Phe-Ala-Gln<sub>152</sub>↓Ser-Ile-Pro (VFAQ<sub>152</sub>↓SIP).<sup>4</sup>

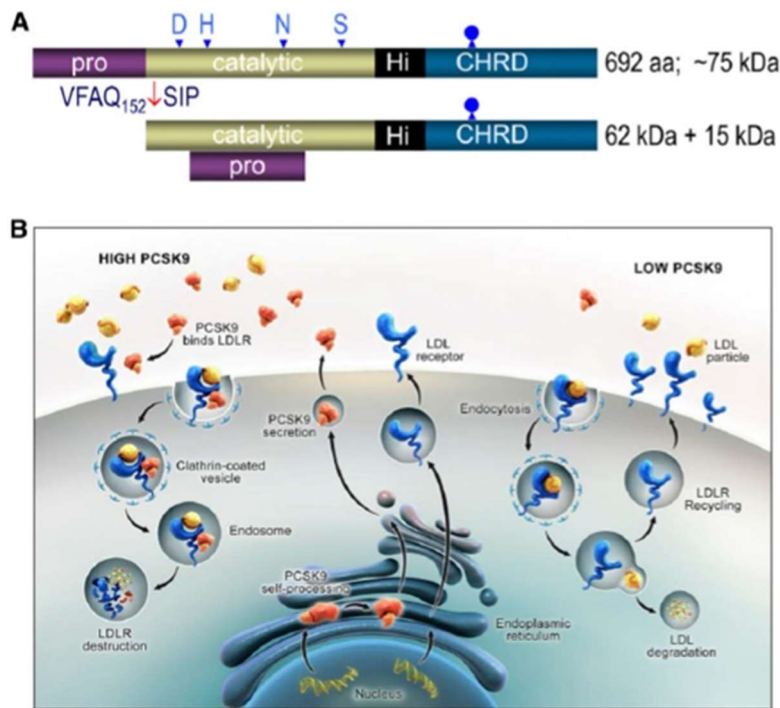


Figura 9.A Rappresentazione schematica di proPCSK9 e della sua forma elaborata  
9.B Percorso degradativo indotto da PCSK9

In figura 9.B è schematizzato il percorso extracellulare di degradazione del LDLR indotto da PCSK9.

La protein chinasi o sue forme GOF (Gain Of Function) promuovono l'endocitosi del complesso PCSK9-LDLR, questo verrà poi convogliato tramite vescicole ai lisosomi che procederanno alla degradazione. Ciò si traduce in una ridotta densità recettoriale sulla superficie cellulare e in un aumento dei livelli di LDL-cholesterol (LDL-c) circolanti.

Ridotte concentrazioni di PCSK9 o forme LOF (Loss Of Function) portano, invece, a maggiori percentuali di LDLR sulla superficie cellulare epatica, in quanto possono essere riciclati ed esposti in superficie dopo la consegna delle particelle di LDL agli endosomi e lisosomi acidi.

Il primo obiettivo di PCSK9 è quello di identificare il recettore sulla superficie degli epatociti, in particolare la subunità catalitica della proteinasi va a legarsi ad un residuo altamente conservato di Leucina in posizione 318 nel dominio del fattore di crescita epidermico-A (EGF-A) presente sul LDLR. Da notare che un dominio simile è stato trovato

La struttura cristallina di PCSK9 ha rivelato che il dominio C-terminale, ricco di Cisteina ed Istidina (CHR), contiene tre strutture ripetute denominate M1, M2, e M3.

Tale dominio è necessario per il processo degradativo dei recettori LDL indotto da PCSK9, infatti, i mAbs prendono di mira proprio il CHR.

in altri membri della superfamiglia dei recettori per lipoproteine: ad esempio nel VLDLR, nel recettore 2 dell'apolipoproteina E (ApoER2), nella proteina 1 correlata al recettore delle lipoproteine a bassa densità (LRP1) ed ecco perché l'attività della protein chinasi è stata studiata anche in altri siti.<sup>4</sup>

In condizioni fisiologiche il LDLR presenta nella sua conformazione un dominio che consente il legame con l'ApoB dell'LDL-c e l'internalizzazione nella cellula epatica del complesso LDL/LDLR. Quest'ultimo viene inglobato in una vescicola endosomiale, nello specifico si lega alle catene pesanti della clatrina, e a questo punto il pH acido degli endosomi provoca la dissociazione allosterica del recettore e il suo riciclaggio sulla superficie cellulare, mentre l'LDL-c viene degradato ad amminoacidi e colesterolo.

Il complesso PCSK9-LDLR va anch'esso incontro ad endocitosi clatrina-dipendente ma, in seguito all'abbassamento del pH nell'endosoma, il residuo C-terminale di PCSK9 lega il "ligand binding domain" del recettore (EGF-A) rafforzando e stabilizzando il legame tra le due proteine, accade cioè il contrario rispetto al normale processo per il quale il pH acido è precursore della dissociazione.

Successivamente la protein chinasi inibisce la modifica conformazionale che avviene di consueto durante la dissociazione allosterica tra LDLR e LDL ed indirizza il recettore verso il lisosoma dove verrà poi degradato (Figura 10). In questo meccanismo di indirizzamento svolge un ruolo fondamentale il dominio C-terminale di PCSK9, come dimostrato dalla perdita della capacità degradativa nel caso in cui nella protein chinasi venisse a mancare questa porzione.<sup>3</sup>

Un'ulteriore complicazione è data dal fatto che PCSK9 può aumentare il degrado di LDLR sia per via extracellulare, legando il recettore sulla superficie cellulare, sia per via intracellulare indipendentemente dall'endocitosi, infatti, l'over-espressione di PCSK9 promuove la degradazione dei recettori per LDL nel reticolo endoplasmatico.

Se questi 2 percorsi sono operativi in tutti i tessuti non è ancora chiaro; a sostegno di questo modello, è emersa una recente osservazione che PCSK9 privo del dominio M2 del CHRD può ancora degradare il LDLR nella via intracellulare, ma non in quella extracellulare, supportando la presenza di due distinti percorsi regolatori.<sup>4</sup>

Gli anticorpi monoclonali anti-PCSK9 utilizzati in terapia prendono di mira la via extracellulare, sequestrando la PCSK9 e quindi impedendone il legame con il recettore.

### **2.3 Meccanismo d'azione di PCSK9**

La PCSK9 viene abbondantemente sintetizzata dal fegato e rilasciata nella circolazione sanguigna.

Essa promuove la degradazione dei recettori per le LDL solitamente localizzati sulla superficie cellulare epatica, i quali hanno il compito di captare e legarsi all'LDL circolante riducendo la colesterolemia plasmatica.

In condizioni normali il complesso LDL-LDLR viene trasportato tramite endocitosi agli endosomi, luogo in cui grazie alle condizioni acide l'LDL è convertito in amminoacidi e colesterolo mentre i recettori vengono trasportati nuovamente sulla superficie cellulare in modo che possano legarsi ad altre LDL e ricominciare il ciclo.

Questa operazione di riciclaggio dei LDLR alla superficie cellulare si verifica circa 150 volte (Figura 10, a sx).<sup>5</sup>

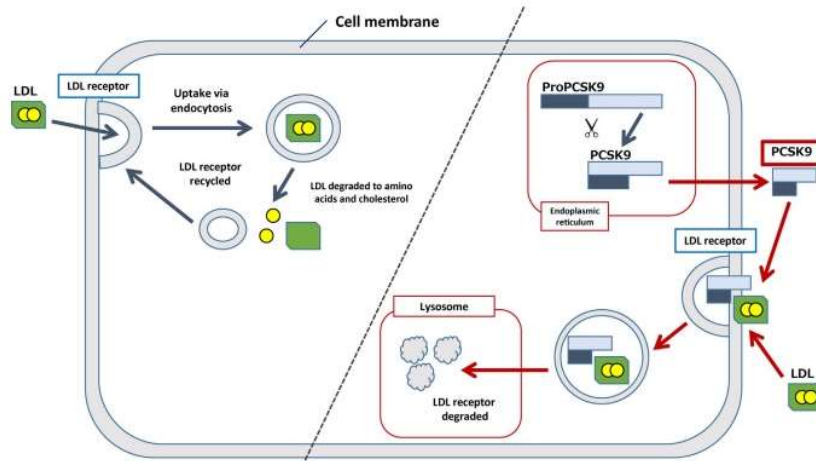


Figura 10. Meccanismo di ricaptazione epatico di LDL (sx) e di PCSK9 (dx)

PCSK9, in seguito alla scissione catalitica del prodominio, viene secreto nel fegato dal reticolo endoplasmatico, si lega ai recettori per le LDL sulla membrana cellulare ed il complesso viene internalizzato in vescicole.

Gli LDLR a cui si è legata la proteinasi vengono indirizzati verso i lisosomi, i quali procederanno alla loro degradazione senza essere riciclati, riducendo così la densità recettoriale sulla superficie degli epatociti. (Figura 10, a destra).

Gli inibitori di PCSK9 interferiscono con la degradazione degli LDLR aumentando la loro espressione sulla superficie cellulare degli epatociti con conseguente riduzione dei livelli circolanti di colesterolo LDL.

Gli anticorpi monoclonali contro la protein chinasi determinano una maggiore espressione a livello epatico dei recettori, con un conseguente pronunciato effetto ipocolesterolemizzante che deriva da un lato dalla riduzione della degradazione recettoriale, in quanto viene inibito l'enzima responsabile di tale effetto, e dall'altro dall'aumento dei processi di internalizzazione delle LDL da parte dei recettori stessi.

In uno studio su una popolazione di soggetti afroamericani portatori di una mutazione LOF, associata ad una perdita di funzione enzimatica tale da ridurre di circa 1 mmol/l i livelli di LDL-c rispetto ai soggetti con variante genetica normale, ha dimostrato una riduzione degli eventi cardiovascolari tra i 40 e i 55 anni del 90%.<sup>3</sup>

Viceversa, polimorfismi genetici GOF di PCSK9 si associano ad un aumento di degradazione dei recettori e di conseguenza un incremento delle LDL circolanti, accentuando l'ipercolesterolemia.

Sono stati generati topi knockout (KO) per PCSK9 e per la proteinasi epato-specifica (HepKO): in entrambi i casi, la mancanza della protein chinasi porta ad un aumento di 2-3 volte la quota di recettori per le LDL nel fegato, pancreas e intestino, senza variazioni nei livelli di mRNA.<sup>3</sup>

## **2.4 Regolazione genica di PCSK9**

L'elemento regolatore degli steroli (SRE) ha un ruolo modulatore nel metabolismo del colesterolo, esso è il sito di legame per le SRE binding-proteins (SREBP) ovvero i più importanti fattori di trascrizione nelle vie biosintetiche dei lipidi.



Poco dopo la scoperta di PCSK9, un'analisi del trascrittoma epatico murino ha constatato che il livello di mRNA della proteinasi era fortemente sottoregolato quando i topi venivano alimentati con una dieta ricca di colesterolo e sovregolato nei topi transgenici con un'aumentata espressione nucleare di SREBP-1 o SREBP-2, le quali hanno dimostrato di legarsi specificamente al promotore del gene di PCSK9 in vitro.<sup>4</sup> Il promotore è altresì regolato da altri ligandi attivanti recettori nucleari, come il PPAR $\alpha$  ovvero il recettore attivato da proliferatori del perossisoma.

Gli agonisti PPAR $\alpha$ , come il fenofibrato, sono comunemente usati per trattare l'ipercolesterolemia e principalmente l'ipertrigliceridemia.<sup>4</sup> I loro effetti sui livelli di mRNA di PCSK9 sono stati a lungo esplorati portando a risultati contrastanti. È stato dimostrato che reprimono l'espressione genica della protein chinasi in una linea cellulare di epatociti umani e murini, ma un altro agonista (WY14643) non ha avuto alcun effetto a livello dell'mRNA.

Le ragioni di questa discrepanza non sono chiare ed è per questo che non sono al momento disponibili in terapia ipolipemizzante agonisti o antagonisti PPAR $\alpha$ .

## **2.5 Modelli animali di PCSK9**

L'espressione di PCSK9 umana nei topi tramite adenovirus porta ad un fenotipo intermedio di LDLR: come previsto infatti, topi transgenici che sovraesprimono PCSK9 sono vitali e fertili, ma gravemente ipercolesterolemici. Anche se recettori per le LDL non sono stati rilevati nei fegati di questi topi, il colesterolo circolante è aumentato solo di un multiplo di 5 rispetto alle 15 volte di incremento registrato nei topi completamente knockout per LDLR. Ciò suggerisce che anche i recettori per le LDL nei tessuti oltre al fegato contribuiscono alla clearance del colesterolo circolante e che in questi siti extraepatici essi non sono regolati dalla PCSK9.<sup>4</sup>

La completa delezione del gene codificante per PCSK9 ha portato ad un calo del  $\approx 40\%$  del colesterolo totale e del  $\approx 80\%$  delle LDL-c. Topi knockout per la proteinasi del fegato mostrano un'ulteriore riduzione di circa il 27% del colesterolo circolante, suggerendo che la protein chinasi epato-specifica contribuisce a  $\approx 70\%$  dei valori di LDL-c.<sup>4</sup>

## **2.6 Relazione tra statine PCSK9**

Come mostrato in figura 11, il colesterolo è sintetizzato principalmente nel fegato a partire dall'Acetil-CoA, l'enzima limitatore di tale sintesi è l'HMG-CoA reduttasi che converte l'HMG-CoA in Mevalonato.

Se si verificasse una diminuzione intracellulare di colesterolo verrebbe attivata una famiglia di fattori di trascrizione denominata "sterol regulatory element-binding proteins" (SREBP), essa consiste in un complesso intracellulare che svolge una funzione sensore e in condizioni ipocolesterolemiche promuove:

1. l'espressione di HMG-CoA reduttasi al fine di aumentare la sintesi del colesterolo,
2. la produzione di recettori per le LDL per reclutare LDL-c plasmatico,
3. l'espressione di PCSK9.

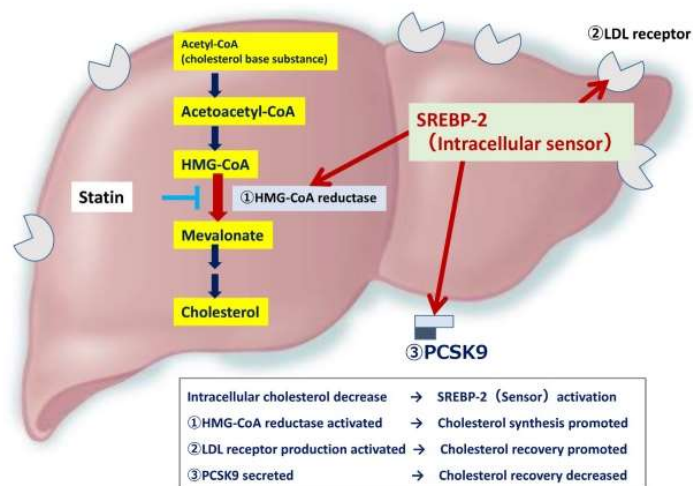


Figura 11. Relazione tra statine, SREBP2 e PCSK9

Allo stesso tempo, livelli elevati di colesterolo intracellulare sono causati da una maggiore espressione dei recettori per le LDL in modo da favorire l'assunzione di colesterolo dal sangue.

Le statine inibendo l'HMG-CoA reduttasi, diminuiscono la sintesi del colesterolo endogeno e migliorano l'attivazione di SREBP-2 in modo da stimolare il recupero delle LDL-c attraverso i recettori, riducendone la quota nel sangue.

Tuttavia, se le statine vengono assunte ogni giorno, anche il reclutamento delle LDL dal torrente ematico continuerà perché i LDLR sono costantemente espressi e aumenterà pure l'espressione di PCSK9 indotta da SREBP-2.<sup>5</sup> Quindi l'organismo ha un elaborato sistema per evitare che il recupero del colesterolo circolante aumenti più del necessario in quanto i recettori per le LDL, la cui espressione viene aumentata dalle statine, sono degradati dalla protein chinasi limitando gli effetti indotti dal farmaco.

Questo spiega in parte la "regola del 6% del trattamento con statine": intendendo che le LDL-c diminuiscono solo di circa il 6% anche se la dose di statina viene raddoppiata.<sup>5</sup>

Il problema fondamentale riguarda il mantenimento dell'equilibrio omeostatico del colesterolo intracellulare.

## **2.7 Risultati clinici**

Come accennato in precedenza, la proteinasi migliora il degrado post-traduzionale dei LDLR, impedendogli di conseguenza di abbassare le LDL-c rendendo PCSK9 un promettente target terapeutico. Proprio per questo motivo le aziende stanno spingendo molto per sviluppare farmaci che imitino gli effetti delle mutazioni LOF della protein chinasi (Figura 12).

Il migliore e più diffuso approccio fino ad oggi consiste nell'utilizzo degli anticorpi monoclonali (mAbs) per PCSK9, i quali bloccano il suo legame con il recettore tramite un meccanismo allosterico.

Tali anticorpi hanno mostrato un notevole decremento del colesterolo nei topi e nelle scimmie, dove una singola iniezione si è tradotta in una sorprendente riduzione delle LDL-c di circa l'80% per più di una settimana.<sup>4</sup>

Sono stati condotti studi clinici di fase I e II sull'uomo da molte aziende farmaceutiche come Sanofi/Regeneron e Amgen: gli studi di fase I hanno confermato sicurezza ed efficacia, mentre per quelli di fase II, entrambe le società hanno segnalato una riduzione del colesterolo variabile tra il 60% e il 70% dopo un'iniezione sottocutanea di  $\approx$ 140-150 mg di mAb ogni 2 settimane, senza alcun significativo aumento degli enzimi epatici.

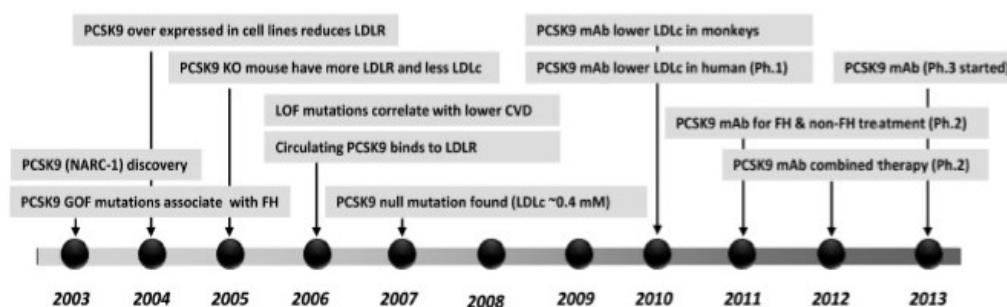


Figura 12. Linea del tempo di PCSK9: dalla scoperta all'uso clinico

In figura 12 viene rappresentata la linea del tempo decennale di PCSK9 comprendente tutte le sue tappe evolutive: dalla scoperta al suo utilizzo in terapia passando per lo studio di tutte le sue mutazioni e target biologici.

Tra i mAbs di largo impiego vanno citati Evolocumab e Alirocumab, i quali hanno ottenuto l'approvazione alla produzione e commercializzazione in Giappone nel 2016 e sono prescritti dal 2017 a pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare (FH) in tutto il mondo. Entrambi vengono somministrati tramite iniezione sottocutanea di 150 mg ogni 2 settimane o di 420 mg ogni mese portando ad una riduzione del 50-60% delle LDL-c.

Il profilo di sicurezza e tollerabilità è molto buono, in particolare per i pazienti con ipercolesterolemia che non ottengono una risposta clinica ottimale alla terapia con statine o coloro che sviluppano importanti effetti collaterali come dolore muscolare, crampi, debolezza, miopatia e rabdomiolisi.

La combinazione di questi mAbs con altri agenti ipolipemizzanti, come statine o ezetimibe, ha prodotto come risultato un'ulteriore diminuzione del colesterolo circolante di circa il 10%, per una riduzione totale dei livelli sierici intorno al 60-65%.<sup>5</sup>

Evolocumab è attualmente in fase di sperimentazione su larga scala per valutare il suo impatto sul rischio di morte per CVD (cardiovascular disease). Nello studio GLAGOV, i cui risultati sono stati presentati nel 2016, si è utilizzata l'ecografia intravascolare per valutare l'effetto sull'evoluzione della placca aterosclerotica nell'arteria coronaria, indotto dall'aggiunta dell'anticorpo in pazienti ipercolesterolemici in terapia con statine.<sup>6</sup> Mentre il volume della placca è aumentato dello 0,05% nel placebo, nel gruppo ricevitore del farmaco è stato ridotto dello 0,95%, dimostrando una significativa regressione della placca e l'efficacia di Evolocumab.

In figura 13 vengono riportati in rosso i valori delle LDL nei pazienti affetti da FH trattati con associazione statine + ezetimibe, mentre in blu i valori dei pazienti FH in terapia con anticorpi monoclonali.

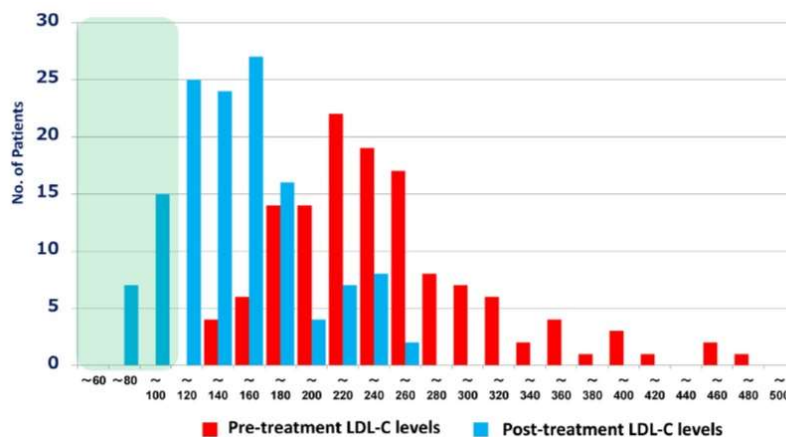


Figura 13. Confronto di efficacia terapeutica tra associazione statine/ezetimibe (in rosso) e mAbs (in blu)

Facilmente si evince che la terapia anti-PCSK9 porta a risultati migliori con una riduzione molto più significativa del colesterolo circolante rispetto alla classica terapia orale, sebbene le iniezioni non siano particolarmente attraenti per il trattamento permanente.

Ad esempio, i pazienti omozigoti con FH per i quali i livelli iniziali delle LDL-c sono di 3 o 4 volte superiori a quelli della popolazione generale, di solito non sono in grado di ottenere una riduzione del 50% con gli agenti orali disponibili e richiedono quindi l'aferesi delle LDL, una forma di dialisi per eliminarle completamente dal sangue.

Sorprendentemente, la somministrazione di un mAb anti-PCSK9 a pazienti affetti da questa patologia con una certa attività residua dei recettori per le LDL, ha comportato una riduzione del  $\approx 30\%$  di colesterolo totale.

In futuro la speranza è quella di riuscire a modulare anche le altre protein chinasi per nuove applicazioni cliniche, ad esempio, PC7 nella regolazione dell'ansia e nell'ipertrigliceridemia.

## **2.8 Riduzione LDL sesso-dipendente**

Nel fegato, pancreas e intestino tenue di topi maschi e femmine KO per PCSK9, la mancata degradazione dei recettori per le LDL, grazie al lavoro svolto da molecole antagoniste della proteinasi, ha portato ad aumenti rilevanti dei livelli totali di LDLR.

Tuttavia, la distribuzione dei recettori differisce in base al sesso e al tessuto. Infatti, la loro immunomarcatura sulla superficie cellulare ha suggerito un aumento nel fegato e nelle isole pancreatiche di topi KO maschi, ma non nelle femmine.<sup>3</sup>

Questa distribuzione specifica per sesso è dettata dagli estrogeni, come dimostrato dall'accumulo di LDLR sulla superficie degli epatociti di topi femmine con ovario ectomizzato e integrati con placebo, mentre quelli integrati con 17 $\beta$ -estradiolo ne esibiscono bassi livelli.

Uno studio randomizzato a lungo termine condotto su 1438 uomini e 872 donne in terapia con mAbs ha portato ai seguenti risultati: nel 65,5% degli uomini e nel 53,4% delle donne si registrano cali di LDL, mostrando quindi un'efficacia superiore del 22% negli uomini.<sup>3</sup>

Tuttavia, un sottogruppo di analisi ha rivelato che le donne in post menopausa hanno risposto con un'efficacia superiore del 16% rispetto alle donne ancora fertili (54,8% contro 47,3%).

La rilevanza fisiologica della suddetta distribuzione assume particolare interesse, ma non è stato ancora dimostrato un riscontro negli esseri umani, in quanto l'efficacia degli anticorpi monoclonali anti-PCSK9 non ha ancora ampiamente esaminato questa dipendenza dal sesso.

## **2.9 PCSK9 e patologie epatiche**

Dato che PCSK9 è prodotta principalmente dal fegato e quest'ultimo è un organo rigenerante, ci si aspettava che le condizioni perturbanti la funzionalità epatica a loro volta influenzassero i livelli di protein chinasi e che venisse condizionata anche la capacità del fegato di guarire da determinati insulti.

Gli studi in vivo hanno confermato tale ipotesi, infatti, topi knockout per PCSK9, ovvero con delezione della proteinasi, e con danno epatico presentano lesioni necrotiche e un significativo ritardo nella capacità di rigenerazione. Fortunatamente però, questo fenotipo è stato invertito con la somministrazione di una dieta ricca di colesterolo.<sup>4</sup>

Questi risultati sono stati la prima indicazione che in pazienti con danno epatico, la terapia anti-PCSK9 potrebbe essere rischiosa; tuttavia, in circostanze normali la carenza di PCSK9 conferisce resistenza alla steatosi epatica riducendo notevolmente l'accumulo lipidico negli epatociti di questi topi.

In conclusione, sebbene l'inibizione di PCSK9 possa proteggere dallo sviluppo della steatosi epatica, può anche comportare un aumentato rischio di danno epatico in un organo che ha già ricevuto un insulto dovuto ad una carente capacità rigenerativa.

Come descritto, il target fondamentale di PCSK9 è il recettore per le LDL, in particolare quello epatico. Nonostante ciò, la funzione della protein chinasi è stata studiata a 360° in modo da comprendere altri suoi ipotetici ruoli ed eventualmente nuove terapie associate.

Di seguito, verranno elencati una serie di siti d'azione extraepatici in cui la PCSK9 esercita un suo contributo modulatore.

## **2.10 Ruolo regolatorio di PCSK9 per Lp(a)**

La riduzione nel plasma dei livelli di PCSK9 si traduce in un abbassamento del 60% per le LDL e del 30–35% per i livelli della lipoproteina altamente aterogena Lp(a); quest'ultima è una classica lipoproteina a bassa densità deputata al trasporto di colesterolo nel sangue che viene associata ad un'apoproteina specifica, ovvero l'Apo(A).

Lp(a) è inoltre in grado di inibire gli enzimi deputati alla dissoluzione del coagulo, cosicché se da un lato la frazione lipidica promuove la formazione di placche aterosclerotiche, dall'altro la porzione proteica contribuisce all'accumulo di coaguli nei vasi.

Quest'osservazione ha aperto le porte ad una nuova potenziale applicazione terapeutica, in quanto Lp(a) è un fattore di rischio aterosclerotico per il quale non era ancora stato identificato alcun agente terapeutico efficace, infatti, non risponde alle terapie standard per la diminuzione delle LDL come dieta, esercizio fisico o statine.

Se la terapia anti-PCSK9 con anticorpi monoclonali sia efficace anche a valle nel ridurre il potenziale inibitorio di Lp(a) sugli enzimi dissolutivi del coagulo e se possa essere

utilizzato nella pratica clinica è ancora oggetto di indagine e studio, certo è che la proteinasi modula anche questa lipoproteina.

### **2.11 Ruolo di PCSK9 in infiammazione, sepsi e infezione virale**

L'infiammazione e l'infezione inducono cambiamenti marcati sul metabolismo di lipidi e lipoproteine.

Un modello d'infezione da parte di batteri Gram-negativi stimola l'espressione di PCSK9 epatica provocando l'aumento dei livelli plasmatici delle LDL e VLDL a causa di una diminuzione di proteine LDLR e VLDLR.<sup>3</sup>

La sepsi o setticemia è una patologia complessa che si instaura comunemente in risposta ad un'infezione batterica e può sfociare in insufficienza multiorgano e shock. È caratterizzata da un'abnorme infiammazione sistemica con rilascio di mediatori chimici, quali interleuchina-6 e proteina C-reattiva, e dall'attivazione della cascata coagulativa.

I sintomi sono: ipertermia, tachicardia, iperventilazione, alterazione della conta leucocitaria con leucopenia (ridotto numero di globuli bianchi) o leucocitosi (aumentato numero di globuli bianchi), ma anche endocarditi, ascessi, piastrinopenia fino ad arrivare allo stadio più grave contraddistinto da shock settico associato a severa ipotensione.

Oggi le terapie includono trattamenti antibiotici e filtrazione ematica attraverso emoperfusione.

Le lipoproteine ed i rispettivi recettori svolgono un ruolo chiave durante la sepsi, favorendo la clearance epatica delle endotossine. A seguito di un'infezione le porzioni lipidiche microbiche non circolano libere nel torrente sanguigno, ma si legano rapidamente a specifiche proteine, fra cui la "microbial LPS-binding protein" maggiormente espressa sulla superficie delle HDL.<sup>7</sup>

Queste evidenze supportano l'ipotesi che la clearance del colesterolo e quella dei lipidi patogeni condivide percorsi comuni. Fattori che migliorano il metabolismo delle LDL nella sepsi potrebbero quindi ridurre l'endotossinemia e migliorare la sopravvivenza.

In effetti una maggiore espressione di recettori è stata associata con protezione da sepsi grave e, soprattutto, si è scoperto che l'interazione PCSK9-LDLR gioca un ruolo chiave in questo contesto (Figura 14.A). Topi con deficit di protein chinasi hanno mostrato un'attenuazione delle risposte sistemiche al trattamento con LPS, mentre la somministrazione di anticorpi bloccanti PCSK9 ha aumentato la sopravvivenza e diminuito l'infiammazione nei topi wild-type.<sup>7</sup> Questo effetto è stato dimostrato dipendere in modo critico da LDLR, poiché l'inibizione di PCSK9 nei topi totalmente knockout per essi non ha comportato una protezione aggiuntiva.

Di recente è stato dimostrato in studi in vivo che gli anticorpi monoclonali anti-PCSK9 hanno ridotto i livelli di endotossine plasmatiche nei topi sottoposti a CLP (pratica clinica che mima la sepsi<sup>3</sup>, consiste nella perforazione del cieco in modo che il materiale fecale invada la cavità peritoneale scatenando una risposta immunitaria indotta dall'infezione microbica esarcebata), attenuando la risposta alle citochine ottenendo tassi di sopravvivenza raddoppiati.

Negli esseri umani i polimorfismi LOF di PCSK9 sono stati associati a migliori tassi di sopravvivenza nei pazienti settici e riduzione dei livelli di citochine, mentre i polimorfismi GOF producono l'effetto opposto.

È importante notare che nei pazienti colpiti da sepsi, i livelli di proteinasi sono correlati positivamente con l'insufficienza respiratoria e cardiovascolare portando all'ipotesi che riducendone i livelli, e quindi aumentando i LDLR, possa esserci un effetto protettivo. Questi risultati suggeriscono un aspetto critico sul ruolo di PCSK9 nella limitazione della clearance dei patogeni lipidici e supportano l'ipotesi che la sua inibizione rappresenti una nuova strategia per il trattamento della sepsi.

Nel modello murino di sepsi indotta con CLP, la carenza di PCSK9 conferisce protezione contro la diffusione batterica sistemica e l'infiammazione dei tessuti, in particolare nei polmoni e fegato, mentre la sovraespressione esacerba precocemente un effetto ipercoagulante e proinfiammatorio.

In soggetti portatori di mutazioni geniche associate a perdita di funzione della protein chinasi è stata osservata una notevole riduzione del rilascio di mediatori dell'infiammazione ed una maggiore sopravvivenza del paziente in corso di sepsi.<sup>6</sup>

In un altro studio sono stati generati topi con la stessa calcificazione vascolare osservata nei pazienti aterosclerotici, a causa della quale si scatena una risposta infiammatoria derivante dalla formazione di cristalli di colesterolo che perforano il vaso e riversano materiale nel torrente sanguigno. Si è visto che i topi in terapia con mAbs risultano protetti, mentre la sovraespressione di PCSK9 esacerba il fenotipo.<sup>3</sup>

Gli studi futuri sono necessari per valutare la promettente efficacia terapeutica di inibitori PCSK9 nella sepsi.

### ***Infezione da HCV***

Il fatto che molte PC possano elaborare le glicoproteine di superficie dei virus infettivi ha spinto i ricercatori a testare l'effetto della mancanza di PCSK9 sull'infettività dei virus epatici, come ad esempio l'epatite C (HCV).<sup>4</sup>

L'infezione da virus dell'epatite C è una delle principali cause di epatite cronica che può portare a cirrosi e carcinoma epatocellulare. Diverse proteine di superficie hanno un ruolo nell'ingresso di HCV all'interno delle cellule, in particolare sono stati segnalati i LDLR e la tetraspanina CD81.

Nella circolazione sanguigna il virus si associa alle lipoproteine LDL e VLDL e, utilizzando i rispettivi recettori, riesce ad entrare nelle cellule epatiche; studi in vitro hanno infatti dimostrato che l'up-regulation di LDLR facilita l'infezione.<sup>4</sup>

L'infezione da HCV in vitro ha portato ad un aumento dell'espressione di LDLR sia a livello proteico che nel comparto trascrizionale, di conseguenza si predispone un crescente assorbimento di LDL. In vivo tale associazione è stata convalidata dal fatto che i fegati dei pazienti con epatite cronica C mostrano una maggiore espressione di LDLR rispetto ai fegati di donatori non infetti.

Di contro, la down-regulation di LDLR ha determinato una ridotta infettività del virus probabilmente a causa di un ridotto assorbimento di colesterolo e altri lipidi coinvolti nei meccanismi replicativi dell'HCV, suggerendo che LDLR potrebbero essere coinvolti nei processi a valle, come l'accumulo intracellulare di lipidi, la regolazione dell'assemblaggio delle particelle del virus e dei tassi di secrezione.

PCSK9 riduce l'espressione di LDLR e CD81 sulla superficie cellulare, mitigando la suscettibilità delle cellule all'infezione da HCV.

È stato dimostrato che l'espressione epatica di CD81 è notevolmente aumentata nei fegati di topi knockout per PCSK9 rispetto a quelli prelevati da animali selvatici.<sup>4</sup> In linea con queste osservazioni, l'incubazione con la proteinasi ha comportato l'incapacità di HCV di infettare le cellule.

PCSK9 degrada i recettori LDLR portando ad un aumento della risposta infiammatoria durante la sepsi (Figura 14.A).

Nel caso in cui però sia presente un'infezione da HCV l'azione della proteinasi su LDLR e CD81 determina un blocco nell'ingresso del virus nell'epatocita riducendone la capacità infettiva (Figura 14.B).

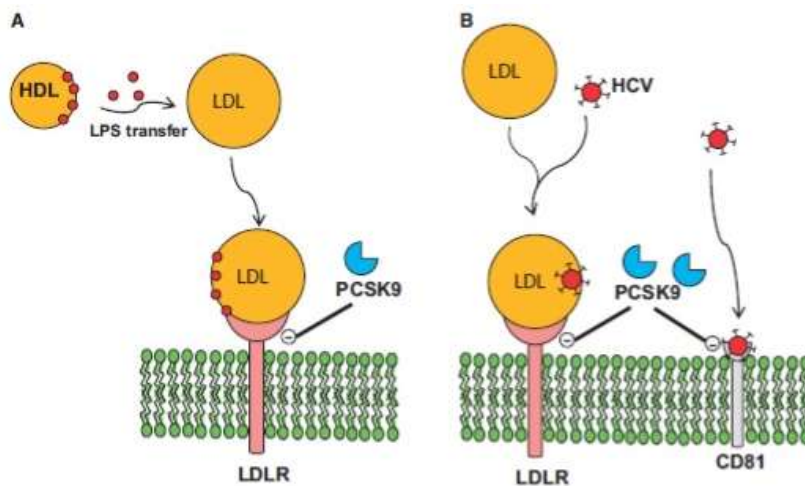


Figura 14. Ruolo di PCSK9 durante un'infezione

Sostanzialmente i recettori LDLR e CD81 sono degradati in modo dose-dipendente da PCSK9 e conseguentemente si ha una riduzione dell'infettività cellulare dell'HCV nei topi perché viene a mancare il punto di ingresso.

Nell'uomo, però, tale evidenza deve ancora essere dimostrata ma complessivamente queste osservazioni suggeriscono che, almeno in vitro, PCSK9 sia potenzialmente protettiva contro il virus dell'epatite C. La correlazione tra l'inibizione della protein chinasi e l'incidenza dell'infezione devono essere perciò attentamente monitorati negli studi clinici di fase 3 e nel post-marketing.

Inoltre, è necessario prestare attenzione nel prescrivere e somministrare inibitori di PCSK9 a soggetti che potrebbero essere infetti da HCV o altri virus che utilizzano  $\geq 1$  dei membri della superfamiglia LDLR come recettori di ingresso.

## **2.12 PCSK9 e parassiti**

Sebbene il colesterolo sia il principale sterolo nei parassiti, essi non hanno la capacità di sintetizzarlo autonomamente e quindi lo devono ricavare dalle cellule dell'ospite o da altre fonti circolanti. A sostegno di questa tesi, infatti, l'infezione parassitaria è solitamente associata ad una riduzione dei livelli plasmatici di colesterolo e ad una composizione lipoproteica alterata nell'ospite.



Il parassita sfrutta le risorse lipidiche dell'ospite creando a quest'ultimo un deficit, inoltre, analogamente al virus dell'epatite C, esso ha la capacità di utilizzare i recettori per le LDL dell'host.

Queste osservazioni suggeriscono che le infezioni parassitarie potrebbero interferire con l'asse LDL-c/LDLR e che, a causa della competizione per il colesterolo, alcune varianti genetiche possano rappresentare un vantaggio per l'ospite o per il parassita.

Dei tre principali polimorfismi a singolo nucleotide senza senso (SNP) di PCSK9 (R46L, Y142X, C679X) il primo è il più frequente tra i soggetti bianchi, mentre gli altri due sono maggiormente presenti tra gli afroamericani. Tutte e tre le mutazioni sono associate ad una perdita di funzione della protein chinasi con conseguente riduzione del 40% delle LDL-c e dell'88% dei tassi di rischio di CHD (Coronary Heart Disease).<sup>7</sup>

È stata proposta l'ipotesi che l'alta frequenza di questi polimorfismi LOF sia l'esito di una selezione naturale volta a proteggere le popolazioni maggiormente a rischio di infezioni parassitarie, in quanto riducendo la quota di colesterolo libero, perché captato dai recettori e utilizzato dagli epatociti dell'ospite, il parassita si trova senza materia prima e soccombe. Se questa ipotesi è corretta, allora questi SNP dovrebbero essere particolarmente frequenti nelle zone dove comunemente sono presenti infezioni parassitarie. A favore di ciò è da notare che la variante C679X è stata identificata nel 3,7% delle donne che frequentano le cliniche prenatali in Zimbabwe ma purtroppo nessun dato ufficiale sull'incidenza delle infezioni parassitarie è al momento disponibile.<sup>7</sup>

### **2.13 Ruoli di PCSK9 in altri organi**

È stata studiata, mediante ibridazione in situ, l'espressione di PCSK9 nell'embrione murino al giorno 14.5 di gestazione: segnali corrispondenti alla presenza della protein chinasi sono stati osservati nel fegato primordiale, nelle membrane embrionali, nell'intestino medio, nell'arteria ombelicale e, in misura minore, nel telencefalo.<sup>6</sup>

Analisi di ibridazione in situ al decimo giorno dopo il parto nel topo hanno rivelato che PCSK9 è principalmente espressa in fegato, intestino tenue, colon, cervelletto e rene.

La funzione di PCSK9 nei tessuti extraepatici però è ancora scarsamente compresa e può mutare durante lo sviluppo.

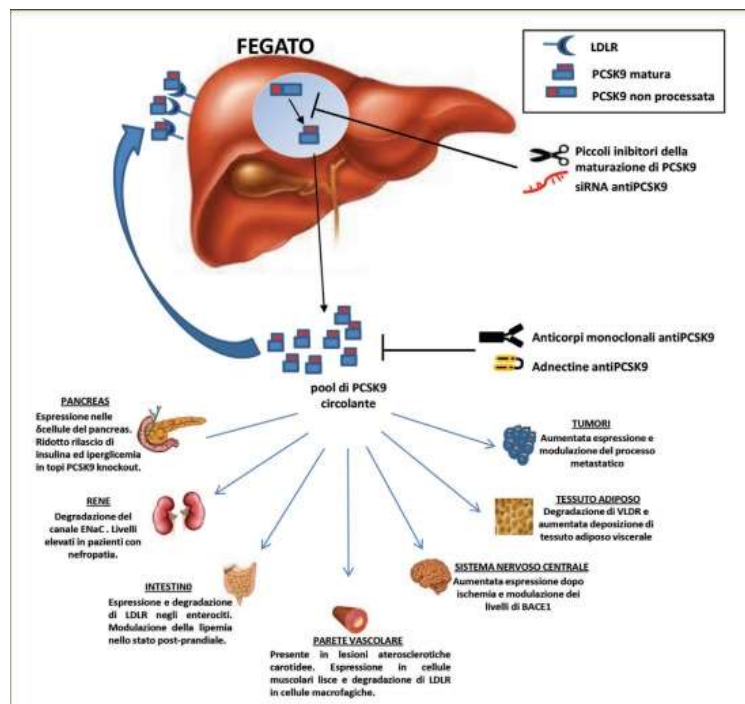


Figura 15. Target di PCSK9 nell'organismo

Diversi studi hanno rivelato che la proteasi non scarta solo i recettori per le LDL ai compartimenti di degradazione lisosomiale, ma anche quelli per le VLDL (VLDLR) e il recettore 2 dell'apolipoproteina E (ApoER2). Entrambi sono intimamente coinvolti nell'idrolisi di lipoproteine ricche di trigliceridi,<sup>4</sup> inoltre anche il trasportatore CD36 è substrato di PCSK9, esso è fondamentale nel facilitare l'assorbimento di acidi grassi (FFA) nell'epitelio intestinale e nel tessuto adiposo.

#### *PCSK9 e VLDL*

Nell'uomo adulto la PCSK9 è espressa principalmente nel fegato, nell'intestino tenue, nei reni e nel pancreas. Sebbene quindi non sia presente negli adipociti,<sup>4</sup> sorprendentemente la proteasi circolante prodotta dal fegato può regolare negativamente i livelli dei recettori delle VLDL sulla superficie cellulare del tessuto adiposo.

Il deficit di proteina aumenta l'espressione superficiale di VLDLR, i quali facilitano l'idrolisi dei trigliceridi e l'assorbimento di FFA negli adipociti viscerali. A giustificazione di questa associazione è stato dimostrato che il grasso viscerale si accumula nei topi carenti di PCSK9 a causa dell'elevato assorbimento di chilomicroni e VLDL-c nei tessuti che esprimono prevalentemente i VLDLR, come il tessuto adiposo appunto, cuore e muscoli.<sup>4</sup> In teoria anche quest'ultimi dovrebbero essere sensibili allo stoccaggio di trigliceridi esprimendo il recettore, ma i muscoli bruciano i grassi continuamente, mentre i tessuti adiposi tendono ad immagazzinare energia sotto forma di goccioline di grasso per un uso successivo.

In conclusione, quindi, riducendo le concentrazioni di PCSK9 si può aumentare la densità recettoriale di VLDLR nell'adipe influenzando la clearance di FFA. In effetti, in topi knockout per PCSK9 alimentati con una sonda gastrica con olio d'oliva, è stato osservato un picco di trigliceridi plasmatico postprandiale ridotto, causato da una maggiore clearance plasmatica operata dai recettori.

Questi risultati confermano ulteriormente come l'inibizione di PCSK9 aumenti il catabolismo delle lipoproteine ricche di trigliceridi (TG) diminuendo i livelli plasmatici di quest'ultimi, ma di conseguenza sostiene anche la possibilità di accumulo di grasso periferico.

#### *PCSK9 e Pancreas*

Il legame tra PCSK9 e disfunzione metabolica si estende oltre alla modulazione VLDLR, in quanto la proteasi è espressa anche nel pancreas.<sup>4</sup> Topi knockout per la proteina chinasi, infatti, presentano una morfologia alterata delle isole pancreatiche.

Due rapporti contrastanti in modelli animali sono stati recentemente pubblicati: uno che mostra un effetto neutro di PCSK9 sulla secrezione di insulina e sulla tolleranza al glucosio, l'altro invece svela che i topi KO sono ipoinsulinemici, iperglicemici e intolleranti al glucosio.<sup>4</sup> In quest'ultimo studio, le isole pancreatiche dei topi presentavano segni di malformazione, apoptosi e infiammazione.

Anche nell'uomo i dati dei portatori di mutazioni LOF per PCSK9 sono in conflitto, con segnalazioni che indicano l'assenza di disfunzione pancreatica e un'altre che supportano un collegamento ad un aumento dell'incidenza del diabete.

#### *PCSK9 e Rene*

Il rene è un altro organo che produce PCSK9 ed in questo sito è stato identificato come suo target il canale epiteliale del Na<sup>+</sup> (ENaC).

ENaC gioca un ruolo critico nel riassorbimento di Na<sup>+</sup> dall'urina, tant'è che la maggior parte dei casi di ipertensione collegati al profilo genetico dipendono da difetti nella sua regolazione.

PCSK9 interagisce con il canale e riduce la sua espressione sulla superficie cellulare aumentando la sua degradazione.

In teoria quindi una riduzione della protein chinasi potrebbe causare un aumento dell'assorbimento renale di Na<sup>+</sup> provocando un rilevante rischio di ipertensione. Tuttavia, nei modelli murini, il deficit di PCSK9 non incrementa l'espressione di ENaC né altera la pressione sanguigna. Tale dato è in linea con i risultati ottenuti sull'uomo: i portatori di mutazioni LOF, infatti, non mostrano una prevalenza di ipertensione rispetto ai non portatori.

Inoltre, negli studi condotti con anticorpi monoclonali contro PCSK9, come Evolocumab o Alirocumab, non è stato segnalato nessun effetto sulla pressione sanguigna fino ad oggi.

I pazienti con funzionalità renale compromessa presentano dislipidemia e un metabolismo lipidico alterato, che a loro volta possono contribuire al peggioramento delle condizioni generali e allo sviluppo di complicanze nel sistema cardiovascolare.

Diversi studi hanno anche valutato la correlazione tra livelli di PCSK9 circolante e malattie renali: nei ratti con induzione di insufficienza renale cronica, i livelli sierici di protein chinasi sono significativamente aumentati con conseguente riduzione dei recettori epatici per le LDL e innalzamento del colesterolo totale circolante.<sup>4</sup> Allo stesso modo pazienti umani con proteinuria glomerulare grave, detta anche sindrome nefrosica, mostrano livelli elevati di PCSK9 che si concretizzano in elevati valori di colesterolo circolante a causa di un deficit di LDLR.

I livelli plasmatici di proteinasi sono elevati in soggetti con proteinuria rispetto a individui sani e l'entità dell'aumento è proporzionale allo stadio della patologia. Inoltre non sono influenzati dalla terapia, così come nei pazienti affetti da malattia renale cronica (CKD) rispetto a soggetti sani.

I meccanismi alla base di questi effetti sebbene siano presunti, nella realtà clinica non sono del tutto chiari. Complessivamente queste osservazioni supportano l'ipotesi di un ruolo di PCSK9 nello sviluppo della dislipidemia in pazienti con patologie renali e suggeriscono che un'indagine sul beneficio dell'inibizione della protein chinasi in tali condizioni fisiologiche debba essere eseguita.

#### *PCSK9 e Intestino Tenue*

L'intestino tenue, in particolare l'ileo, è ricco di PCSK9 e di VLDL, le quali rappresentano una parte significativa dei lipidi plasmatici nello stato postprandiale.

L'espressione della proteinasi nell'intestino è quantitativamente seconda solo a quella epatica.

Studi in vivo e in vitro hanno dimostrato che la protein chinasi, degradando il recettore per le VLDL, aumenta l'assemblaggio e la secrezione di lipoproteine intestinali ricche di TG portando all'accumulo di lipidi all'interno degli enterociti.<sup>3</sup> Inoltre, studi su specie murine hanno dimostrato che l'assenza di PCSK9 riduce la secrezione di ApoB (apolipoproteina specifica delle VLDL intestinali) e protegge i topi da ipertrigliceridemia postprandiale.

PCSK9 influenza anche l'assorbimento intestinale del colesterolo, infatti, la sua aggiunta esogena agli enterociti in coltura ha ridotto l'espressione di NPC1L1, una proteina chiave nell'assorbimento intestinale del colesterolo.

Sebbene gli esatti meccanismi cellulari a sostegno dell'aumento di lipoproteine ricche di TG negli enterociti indotto da PCSK9 non siano totalmente compresi, le prove disponibili supportano l'ipotesi di un importante ruolo della proteina sul traffico di lipidi cellulari.

#### *PCSK9 e Cervello*

PCSK9 è stata inizialmente scoperta come una proteina la cui espressione veniva indotta nei neuroni cerebellari primari in seguito all'attivazione del processo di apoptosi e per questa ragione chiamata Neural Apoptosis Regulated Convertase 1 (NARC-1).

Dopo numerosi studi è emerso che i due target della proteinasi nel cervello sono VLDLR e ApoER2, entrambi fondamentali per la migrazione neuronale e lo sviluppo cerebellare.

La sua presenza è stata rilevata anche nel liquido cerebrospinale, sebbene ad un livello circa 50-60 volte inferiore a quello riscontrato nel siero e nelle cellule che presentano un elevato indice proliferativo, nello specifico è stato osservato un transitorio aumento d'espressione di PCSK9 nel telencefalo e nel cervelletto durante il periodo gestazionale nei roditori.<sup>4</sup>

Nella review "Biology of proprotein convertase subtilisin kexin 9: beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering" di Norata G.D. et al, emerge inoltre che i topi KO per PCSK9 sono vitali e non mostrano alterazioni rilevanti nel cervelletto, nell'ippocampo o nella corteccia, in accordo con l'osservazione che gli esseri umani con mutazioni LOF non mostrano difetti neurologici degni di nota.

Nello zebrafish, invece, il knockdown embrionale di PCSK9 provoca neurogenesi difettosa, disorganizzazione dei neuroni cerebellari e morte embrionale a 96 ore dopo la fecondazione. Quest'ultima scoperta suggerisce un possibile ruolo diverso per la protein chinasi nello sviluppo della centrale sistema nervoso (SNC) nei mammiferi e nei pesci.

A seguito di ictus ischemico transitorio sperimentale nei topi, i livelli di mRNA di PCSK9 aumentano nell'area lesa 24-72 h dopo la riperfusione per poi tornare ai livelli basali dopo 1 settimana.<sup>7</sup>

Dopo l'ischemia l'espressione di LDLR è ridotta nell'area lesa del cervello, ma anche nei topi privi di PCSK9 la riduzione dei livelli recettoriali è significativamente attenuata; tuttavia, i livelli di ApoE aumentano in modo simile in entrambi i gruppi nelle aree della lesione rispetto al lato non lesionato.

Questi risultati indicano che l'inibizione di PCSK9 non dovrebbe interferire con lo sviluppo del cervello o influenzare il recupero cerebrale dopo un ictus ischemico, in accordo con le osservazioni che i soggetti portatori delle varianti associate a perdita di funzione sono sani. I gliomi umani sono tumori maligni del SNC caratterizzati da proliferazione eccessiva ed espansione nel tessuto cerebrale circostante. Recentemente è stato dimostrato che PCSK9 regola l'apoptosi in un modello di neuroglioma umano, infatti, il suo silenziamento da parte di siRNA ha inibito la proliferazione cellulare ed ha aumentato la concentrazione di proteina anti-apoptotica. Al contrario, la sovraespressione di PCSK9 ha promosso la proliferazione.

Si potrebbe quindi ipotizzare che l'inibizione della proteinasi possa rappresentare una possibile strategia terapeutica per il trattamento del neuroglioma, tuttavia, i dati disponibili sono ancora estremamente scarsi.

L'apoptosi neuronale è un processo cruciale durante il normale sviluppo del sistema nervoso centrale, ma può anche assumere una connotazione patologica nell'eziologia di malattie neurodegenerative nel cervello adulto, in quanto può indurre la perdita dell'integrità della rete neuronale.

La PCSK9 è stata identificata come una delle numerose proteine la cui espressione è sovraregolata durante l'apoptosi indotta dalla perdita di potassio in colture neuronali dei granuli cerebellari (CGN).

La sovraespressione transitoria di PCSK9 ricombinante in CGN aumenta l'attività delle caspasi-3 e la fosforilazione delle giunzioni, mentre diminuisce l'espressione di ApoER2 e VLDLR; a tutto ciò è associato un aumento dell'apoptosi neuronale (figura 16).

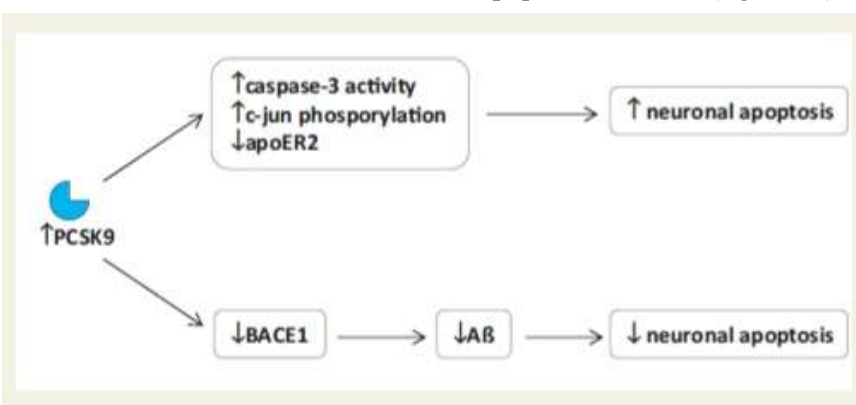


Figura 16. Ruolo di PCSK9 nell'apoptosi neuronale

In studi in vivo si è riscontrato che sebbene PCSK9 possa legare LDLR, VLDLR e ApoER2, i cambiamenti nell'espressione della proteinasi non modificano la concentrazione recettoriale nel cervello del topo adulto. Tant'è che non è stata osservata alcuna alterazione nei livelli di LDLR nel cervello di animali con mutazioni GOF.

Questi risultati contrastanti possono essere spiegati supponendo o che PCSK9 abbia una funzione specifica per cellula/tessuto o dall'osservazione che, essendo il livello di PCSK9 nel cervello del topo adulto molto più basso che nel fegato, non possa modulare i livelli dei recettori in questo distretto.

Teoricamente l'abbassamento del colesterolo potrebbe indurre effetti sul cervello: in quest'organo, infatti, esso è un riveste un ruolo essenziale per lo sviluppo neuronale, la sua riduzione quindi potrebbe avere effetti negativi sulla funzione cerebrale.

In questo contesto, è stata rivolta particolare attenzione alla potenziale alterazione della funzione cognitiva indotta dalle statine, ma i sintomi segnalati erano generalmente di scarso grado e reversibili con l'interruzione della terapia. Al contrario, l'ipercolesterolemia è considerata un significativo fattore di rischio per il morbo di Alzheimer (AD) e altre malattie.

Se le considerazioni fatte per le statine possano essere estese anche ad altri farmaci ipolipemizzanti, compresi gli inibitori di PCSK9, è ancora una questione di discussione. Va riconosciuto che bassi livelli di colesterolo plasmatico, come quelli dovuti alle varianti LOF nel gene codificante per PCSK9, comunque non sono stati associati con deterioramento cognitivo.

È quindi possibile che PCSK9 influisca sulla funzione neurologica indipendentemente dalla modulazione dei recettori delle lipoproteine? Processi neurodegenerativi che portano

alla progressiva perdita di tessuti neurali caratterizzano le malattie neurologiche, come il morbo di Parkinson e l'AD. In particolare, la produzione eccessiva e l'accumulo di peptide  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) nel cervello è un segno distintivo dell'AD, con conseguente formazione di lesioni neurofibrillari.

BACE1 (proteina precursore della  $\beta$ -amiloide) è una proteina di membrana che catalizza una fase limitante nel metabolismo amiloidogenico portando alla generazione di A $\beta$ . Esso viene transitoriamente acetilato su sette differenti residui di Lisina nel lume del reticolo endoplasmatico, a cui segue la deacetilazione nel lume dell'apparato di Golgi. Questa acetilazione transitoria è necessaria affinché la proteina nascente lasci l'ER e proceda verso la via secretoria, mentre la proteina non acetilata viene trattenuta e degradata.

È stato dimostrato che PCSK9 contribuisce allo smaltimento di BACE1 non acetilato, di conseguenza regola anche il tasso di produzione di A $\beta$  (figura 16).<sup>7</sup>

In vitro, la sovraespressione della proteinasi comporta la riduzione dei livelli endogeni di BACE1, mentre il down-regulation di PCSK9 da parte di siRNA ha completamente normalizzato i livelli.

I topi KO per la protein chinasi hanno mostrato valori più elevati di BACE1 e  $\beta$ -amiloide nella neocorteccia.<sup>7</sup> Tuttavia, un altro lavoro ha riportato una mancanza d'effetto sull'eliminazione di BACE1 nel cervello del topo in seguito a sovraespressione di PCSK9, con una concomitante mancata azione anche sui livelli di A $\beta$ . Gli autori hanno quindi concluso che la protein chinasi non ha alcun risultato concreto su questi recettori e sull'enzima in vivo.

Perciò, il ruolo di PCSK9 sulla biologia del cervello rimane controverso e in fase di studio.

Nonostante ciò, si è voluto testare se il trattamento con mAb anti-PCSK9 portasse a qualche frutto a livello cerebrale: nella maggior parte degli studi condotti la terapia non conduce a scompensi neurali, tuttavia due studi, sebbene non statisticamente significativi, hanno riportato un aumento degli eventi avversi neurocognitivi nel gruppo trattato con mAb, tra cui quello di Lipinski et al.<sup>8</sup>

Una rassicurazione della mancanza di eventi neurocognitivi avversi in seguito a somministrazione di anticorpi monoclonali anti-PCSK9 deriva da un'analisi completa di 28 studi dimostranti che sia Alirocumab che Evolocumab sono associati ad un tasso di reazioni neurocognitive avverse simile a quello dei controlli <sup>7</sup>:

- 0,7% con placebo vs 0,8% con Alirocumab
- 1,0% con ezetimibe vs 0,9% con Alirocumab

Da notare che non è stata trovata alcuna correlazione tra eventi neurocognitivi e il grado di riduzione di colesterolo circolante, suggerendo che bassi livelli di LDL-c (<25 mg/dl) non provocano direttamente disfunzioni neurocognitive. Questa osservazione è in accordo con il fatto che le lipoproteine che trasportano il colesterolo non possono attraversare la barriera emato-encefalica (BEE) e quindi il colesterolo cerebrale è sintetizzato de novo ed è indipendente dai livelli circolanti.

Sebbene né i mAbs né la PCSK9 riescano ad oltrepassare la BEE a causa delle loro dimensioni, ha destato qualche dubbio l'ipotesi che malattie neurologiche come il morbo di Alzheimer e la sclerosi multipla possano essere causate dall'ingresso di sostanze normalmente escluse dal cervello, come gli anticorpi, in seguito ad un presunto evento in grado di aumentare la permeabilità della barriera.

Sebbene non conclusivi i dati ottenuti hanno comunque una rilevanza clinica, infatti, anche se in condizioni fisiologiche gli anticorpi non attraversano la barriera emato-encefalica, alcune condizioni patologiche, possono aumentarne la permeabilità. Successivamente ad un ictus ischemico acuto, ad esempio, la BEE viene interrotta e questa perturbazione persiste per giorni; nel diabete mellito si hanno anomalie microvascolari cerebrali che portano a disfunzione della barriera; in concomitanza a malattie cerebrovascolari acute e croniche e, in alcuni casi, dopo un intervento di cardiocirurgia.

Complessivamente queste osservazioni suggeriscono la necessità di più tempo di follow-up insieme ad una più rigorosa valutazione neurocognitiva per definire una possibile associazione tra inibizione di PCSK9 e aumento del rischio di disturbi neurocognitivi.

In sintesi, il ruolo della proteinasi nel cervello è ancora ampiamente dibattuto e la maggior parte dei risultati controversi derivano da sistemi cellulari in vitro e manipolazioni selettive nei modelli animali, mentre i dati negli esseri umani sono ancora inconcludenti. Resta quindi da chiarire se l'inibizione di PCSK9 in questo contesto può essere vantaggiosa in qualche patologia.

#### *PCSK9 e Parete Arteriosa*

PCSK9 induce una perturbazione del metabolismo lipidico con conseguente variazione dei livelli lipidici circolanti; tale assioma rappresenta il meccanismo più ovvio che lega la proteinasi chinasi all'aterosclerosi. Tuttavia, recentemente sono stati condotti studi sia sperimentali sia clinici al fine di verificare un effetto diretto di PCSK9 sulla placca aterosclerotica. I risultati di questi studi hanno chiarito che l'azione pro-aterosclerotica non è dovuta esclusivamente all'effetto sulle concentrazioni plasmatiche di LDL-c.

Attraverso metodi PCR è stata dimostrata la presenza di PCSK9 anche nelle lesioni aterosclerotiche carotidee, sebbene ad un livello molto più basso rispetto agli epatociti.

Tra i diversi tipi cellulari presenti a livello della placca aterosclerotica le cellule muscolari lisce (CML) sembrano essere quelle che contribuiscono maggiormente alla produzione di PCSK9 e, in misura minore, anche le cellule endoteliali concorrono a tale scopo.

Da un punto di vista meramente funzionale PCSK9, una volta rilasciata dalle CML, influenza in modo paracrino l'espressione degli LDLR sulla superficie cellulare dei macrofagi inducendo la loro degradazione e regolando in questo modo il legame e l'uptake di lipoproteine aterogene con effetti locali che possono influenzare l'omeostasi vascolare e l'aterosclerosi.

Un aspetto interessante è il fatto che in uno stato infiammatorio PCSK9 aumenta l'espressione di LOX-1 sulla superficie di cellule muscolari lisce, favorendo l'accumulo di LDL ossidate nella parete arteriosa, suggerendo quindi la possibilità che la proteinasi moduli la composizione cellulare della lesione aterosclerotica stessa. A tal proposito è stato recentemente dimostrato che la mancanza di PCSK9 riduce l'aterosclerosi e l'accumulo a livello aortico di esteri del colesterolo in topi KO, i quali sviluppano lesioni significativamente più piccole rispetto a quelle di topi wild-type.<sup>7</sup>

L'espressione locale di PCSK9 nei macrofagi non influenza né i livelli lipidici plasmatici né la dimensione della lesione aterosclerotica, ma la proteina si accumula nella parete dell'arteria inducendo l'infiltrazione di monociti al suo interno, i quali sono precursori di macrofagi, ovvero cellule a carattere proinfiammatorio, tant'è che la monocitosi è un chiaro segno distintivo dell'infiammazione tissutale.

È interessante notare che l'accumulo di PCSK9 nella parete dell'arteria e la sua capacità reclutativa dei monociti nella parete arteriosa sono stati completamente aboliti quando i macrofagi non esprimono LDLR.

I cambiamenti nei livelli plasmatici di proteinasi possono anche influenzare la funzione dei macrofagi, poiché il deficit di PCSK9 è associato ad una riduzione Ox-LDL indotta dall'espressione di citochine da parte dei macrofagi stessi.

Diversi ulteriori studi supportano l'ipotesi che PCSK9 possa avere un ruolo nei processi infiammatori, in quanto i livelli di protein chinasi sono correlati alla conta dei globuli bianchi nei pazienti con malattia coronarica.

L'interleuchina pro-infiammatoria (IL)-1b interrompe la regolazione a feedback negativo mediata dal colesterolo tramite i suoi recettori LDLR nelle cellule muscolari lisce, causando così un massiccio assorbimento delle LDL e la trasformazione delle cellule schiumose.

In test murini la PCSK9 espressa dai macrofagi promuove la differenziazione infiammatoria dei macrofagi e aumenta l'infiltrazione dei monociti nella parete arteriosa, viceversa il trattamento anti-PCSK9 riduce il reclutamento di monociti e protegge dallo shock settico indotto dalla somministrazione di LPS.<sup>7</sup>

Inoltre, è stato suggerito che la proteina interagisca anche con altre lipoproteine a bassa densità, come ad esempio LRP1 e conduca al suo degrado in molti tipi cellulari, compresi i macrofagi. Come nel macrofago la carenza di LRP1 è stata associata ad un aumento dell'aterosclerosi, è anche possibile che PCSK9 interagisca con LRP1 nella placca migliorando la risposta infiammatoria locale.

Il coinvolgimento diretto della protein chinasi nella formazione della placca aterosclerotica è stato dimostrato da uno studio che ha valutato l'effetto dell'anti-PCSK9 Alirocumab in un modello murino di aterosclerosi: questo studio ha dimostrato che l'anticorpo da solo o in combinazione con atorvastatina ha ridotto significativamente i lipidi plasmatici impedendo il degrado dei recettori per le LDL.<sup>7</sup> Ciò ha comportato un miglioramento nella morfologia della placca e un limitato sviluppo dell'aterosclerosi, accompagnato da una diminuzione del contenuto necrotico. Di contro, si è registrato un aumento delle cellule muscolari lisce e del deposito di collagene.

Questi risultati suggeriscono la possibilità che terapie anti-PCSK9 possa prevenire la formazione di nuove lesioni aterosclerotiche.

Con la scoperta di PCSK9 nel 2003 le terapie a carattere ipolipemizzante hanno avuto un'importante svolta con gli inibitori di PCSK9 che hanno assunto innegabilmente largo consenso e merito.

Le basi molecolari a supporto dell'azione della proteinasi seguono un modello in cui PCSK9 è auto-scissa, secreta, e strettamente legata al dominio EGF-A degli LDLR. Ciò riduce il riciclaggio e la downregulation di LDLR, aumentando così i livelli di LDL-c nel sangue. Pertanto, PCSK9 svolge un ruolo chiave nell'omeostasi del colesterolo.

Pazienti con alti livelli di mutazioni GOF possiedono elevate quote plasmatiche di LDL-c e un significativo rischio di CVD durante la loro vita; pazienti con bassi livelli di PCSK9 presentano invece il quadro opposto.

Inoltre, la protein chinasi mostra effetti metabolici pleiotropici che devono essere ulteriormente approfonditi.



Gli anticorpi monoclonali sono attualmente i più avanzati inibitori di PCSK9 in termini di sviluppo farmacologico e risposta clinica.

Studi a lungo termine stabiliranno se gli effetti benefici sui livelli di LDL-c di questa inibizione si tradurranno direttamente in un'efficace riduzione del rischio di CVD. Nonostante l'apparente sicurezza, ci sono preoccupazioni riguardo la totale inibizione di PCSK9 perché sappiamo ancora poco sulle sue funzioni fisiologiche extraepatiche.



### **3.STRATEGIE TERAPEUTICHE ATTUALI: PRO E CONTRO**

L'ipercolesterolemia è tra i principali fattori che concorrono allo sviluppo dell'aterosclerosi, tale deposito di colesterolo e agenti infiammatori nei vasi aumenta drasticamente il rischio di incorrere in eventi cardiovascolari. Infatti, l'accumulo di colesterolo a livello delle pareti di medio e grosso calibro, determina, dapprima, una parziale riduzione del lume causando eventi clinici quali l'angina stabile e, successivamente, la perforazione del cappuccio fibroso e la generazione dell'evento trombotico con conseguente occlusione vasale che determina l'infarto miocardico o l'ictus cerebrale.

Le patologie cardiovascolari sono la prima causa di morte al mondo e, proprio per questa gravante, nel corso degli anni si sono studiate varie strategie che rifornissero l'arsenale terapeutico disponibile, allo scopo di ottenere risultati clinici migliori e ridurre sempre di più gli effetti collaterali, le interazioni farmacologiche e le complicanze.

In questo capitolo andrò ad analizzare i vari protocolli terapeutici che sono al momento adottati nel trattamento dell'ipercolesterolemia, partendo dagli integratori alimentari nutraceutici fino ad arrivare agli approcci più all'avanguardia nei casi di maggior resistenza, passando per le terapie standard e convenzionali.

#### **3.1 Integratori ad azione ipocolesterolemizzante**

Il 78% della popolazione europea ha valori di LDL superiori alla soglia limite di sicurezza, portando, di conseguenza, ad un incremento delle ospedalizzazioni e dell'incidenza di eventi cardiovascolari. Ecco perché risulta necessario ed opportuno agire anche nei pazienti più giovani aventi valori di colesterolo circolante oltre la norma, in modo da prevenire ed evitare l'accumulo di LDL-c nelle arterie.

Proprio per questa ragione, ai pazienti che non hanno mai avuto eventi cardiovascolari e sono debolmente ipercolesterolemici, ossia in prevenzione primaria, viene consigliata l'assunzione di prodotti fitoterapici ipolipemizzanti: quest'ultimi altro non sono che medicinali, approvati dall'AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco) in termini di qualità, sicurezza ed efficacia, il cui principio attivo risulta essere una sostanza vegetale.

Tra i più conosciuti si cita, ad esempio, la *Cynara scolymus*, ovvero il carciofo, la cui droga risiede nelle foglie radicali spezzettate e accuratamente essiccate. Il principale componente ad azione ipocolesterolemizzante è la luteolina, cioè un insieme di esterosidi del luteolo, tale flavonoide inibisce la sintesi endogena di colesterolo seppur in modo alquanto ridotto, dando quindi scarsi risultati clinici.

Per stabilire il meccanismo d'azione della luteolina si è andati ad introdurre in vitro il precursore del colesterolo, l'Acetil-CoA, marcato radioattivamente, in modo da poter facilmente determinare la quota di LDL sintetizzata dal fegato attraverso il riconoscimento del marcatore; in un secondo step si è ripetuto il procedimento con l'aggiunta della luteolina in modo da poter decretare se la quantità sintetizzata fosse ridotta rispetto a quella ottenuta senza flavonoide e confermare la veridicità della tesi di partenza.

Il *Berberis vulgaris* è un altro nutraceutico che deve la sua azione ipocolesterolemizzante alla berberina, un alcaloide contenuto nella corteccia e nel rizoma della pianta. Essa agisce aumentando l'attività ed il numero di recettori epatici per le LDL, facilitando la riduzione

della colesterolemia; spesso viene anche utilizzata in associazione con le statine per ottenere un effetto sinergico ed operare in più fronti.

Questa sostanza è salita nel podio della cronaca scientifica nel 2004, con lo studio pubblicato sul "Nature Medicine" da Kong, Wei J, Abidi et al. ("Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins"). Durante questa ricerca, la berberina assunta per os da 32 pazienti ipercolesterolemici per tre mesi ha ridotto il colesterolo plasmatico del 29%, i trigliceridi del 35% e le LDL del 25%.<sup>9</sup>

Primo fra tutti i fitoterapici utilizzati nel trattamento dell'ipercolesterolemia in termini di benefici clinici è sicuramente il *Red Yeast Rice* (RYR), ovvero il riso rosso fermentato.

Come si evince dal nome, esso deriva dalla fermentazione dell'*Oryza Sativa* operata dal lievito *Monascus Purpureus*: grazie all'azione di quest'ultimo, il riso si arricchisce di Monacolina K, una sostanza utile nella riduzione dei livelli ematici di colesterolo, ed assume la tipica colorazione rossa dovuta alla presenza di pigmenti che vengono sottoprodotti nel processo fermentativo.

Il RYR contiene:

- zuccheri, principalmente amido dal 25% al 73%,
- proteine dal 14% al 31%,
- acqua dal 2% al 7%,
- acidi grassi dall'1% al 5%,
- pigmenti,
- steroli,
- isoflavoni.

Durante il processo di fermentazione il lievito arricchisce il riso di polichetidi, le cosiddette monacoline, che possiedono una spiccata azione ipocolesterolemizzante. A seconda delle condizioni di fermentazione del lievito ed il ceppo utilizzato, sono stati identificati fino ad oggi diversi tipi di monacoline, compreso il sottotipo K.

Quest'ultimo è presente tra il 70 e l'83% del contenuto totale di polichetidi ed è chimicamente indistinguibile dalla Lovastatina (figura 17), un profarmaco convertito dalla forma lattonica inattiva a quella idrossiacida attiva per azione di un'esterasi. Allo stesso modo, data la completa omologia tra le due molecole, anche la Monacolina K è presente in entrambe le forme chimiche, sia lattonica che idrossiacida, in un rapporto che dipende dal pH ambientale.

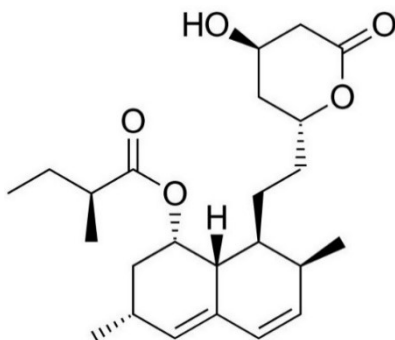


Figura 17. Formula chimica della Lovastatina

Nel riso rosso fermentato si trova, quindi, a tutti gli effetti un farmaco che convenzionalmente è venduto dopo presentazione di ricetta medica ripetibile e, proprio per questo motivo, è tutt'oggi in corso un dibattito etico sulla sua commercializzazione in libera vendita.

Confrontando i profili farmacocinetici delle due molecole nell'organismo è stato visto che la biodisponibilità della Monacolina K è del 20%, 4 volte superiore a quella della Lovastatina. Per questa ragione i prodotti fitoterapici che contengono 2-5 mg di principio attivo hanno lo stesso effetto ipocolesterolemizzante della Lovastatina 20 mg.

Solitamente, la concentrazione di monacolina negli integratori alimentari di RYR è del 1,9%.

È stato condotto uno studio volto a confrontare il tasso di dissoluzione, lo stato fisico e la biodisponibilità orale del principio attivo (PA) in tre prodotti a base di RYR (LipoCol Forte, Cholestin e Xuezhikang) con quelli di due compresse di Lovastatina presenti in commercio (Mevacor o Lovasta). I risultati, presentati in figura 18, hanno dimostrato che il tasso di dissoluzione del PA nei prodotti fitoterapici è più veloce e superiore a quello ottenuto nelle compresse di farmaco.<sup>10</sup>

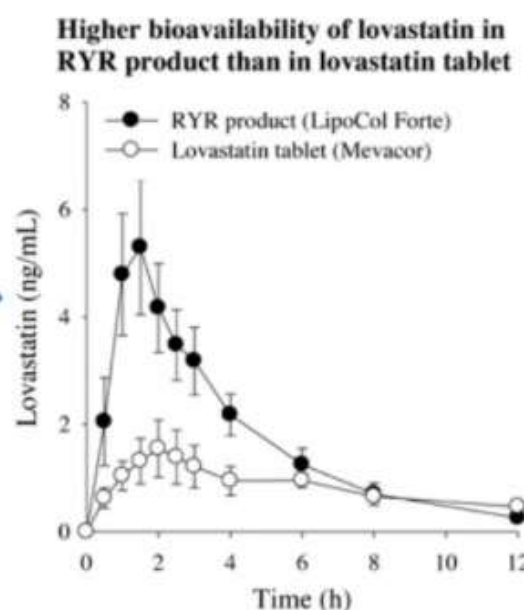


Figura 18. Profilo della biodisponibilità di Lovastatina e Monacolina K

Inoltre, la diffrazione a raggi X della molecola polverizzata ed i modelli di calorimetria a scansione differenziale hanno dimostrato che la cristallinità della Lovastatina era ridotta nei prodotti a base di RYR.

Negli studi sull'uomo, i valori di AUC e Cmax sia per la statina che per il suo metabolita attivo, sono risultati significativamente più elevati nei volontari che ricevevano LipoCol Forte capsule rispetto a quelli che ricevevano Mevacor compresse.

Questi dati suggeriscono che la biodisponibilità orale della molecola è significativamente maggiore nei prodotti fitoterapici a causa di un tasso di dissoluzione più elevato e della ridotta cristallinità.

Nei prodotti a base di RYR il rapporto lattone inattivo/acido attivo varia fortemente, in particolare, la forma acida varia dal 5% al 100% sul totale, influenzando notevolmente la biodisponibilità della molecola. L'apertura dell'anello lattonico può avvenire in condizioni alcaline oppure grazie l'azione enzimatica operata dalla famiglia del citocromo epatico P450 (CYP) o dell'intestino tenue.

Se da un lato l'esercizio fisico e la dieta possono aiutare almeno in parte a ridurre i livelli di colesterolo circolante, dall'altro lato è risaputo che la sintesi epatica è la principale fonte di LDL-c totale.

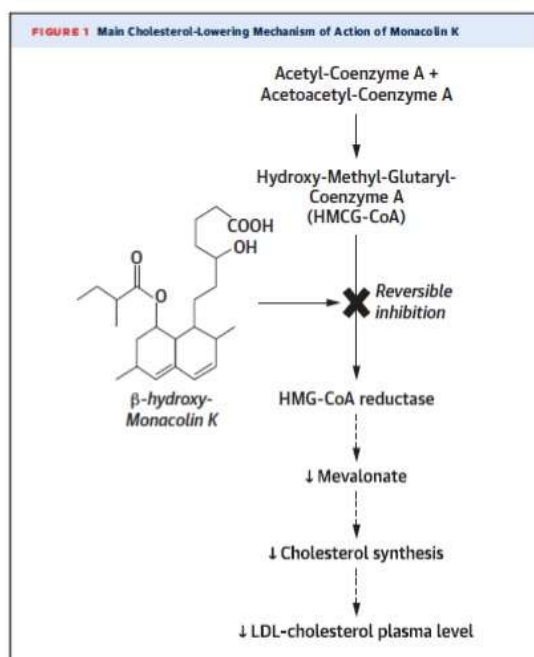


Figura 19. Meccanismo d'azione della Monacolina K

Il meccanismo d'azione ipocolesterolemizzante di RYR è dovuto alla capacità della Monacolina K di inibire reversibilmente il 3-idrossi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasi, un enzima chiave nella via biosintetica del colesterolo; lo stesso meccanismo inibitorio è adottato dalle statine con risultati più che evidenti. (Figura 19).

In questo modo viene bloccata a monte la sintesi di colesterolo endogeno riducendone in modo considerevole i livelli plasmatici.

L'efficacia ipolipemizzante dell'estratto di riso rosso fermentato è stata confermata da alcune metanalisi comprendenti numerosi studi clinici randomizzati (RCT). La più recente ha incluso 6.663 soggetti e 20 studi dimostrando che dai 2 ai 24 mesi di trattamento, il RYR ha ridotto i livelli di LDL-c con una media di 1,02 mmol/l rispetto a placebo, effetto paragonabile a quello ottenuto con statine a basso dosaggio, come ad esempio pravastatina 40 mg, simvastatina 10 mg o lovastatina 20 mg.

È stato anche osservato un modesto aumento delle lipoproteine ad alta densità (HDL-c), una diminuzione trascurabile dei trigliceridi rispetto al placebo e una riduzione significativa dei livelli plasmatici di apolipoproteina B.<sup>11</sup>

L'associazione di RYR con altri composti bioattivi aventi meccanismi d'azione diversi può essere funzionale per ottenere un effetto ipocolesterolemizzante sinergico: il riso rosso fermentato, inibendo la sintesi endogena di colesterolo, è infatti spesso coadiuvato a sostanze che limitano l'assorbimento intestinale dei lipidi, quali fibre solubili, glucomannano, steroli vegetali, probiotici o che migliorano l'assorbimento epatico di colesterolo agendo sui recettori LDLR, come la berberina.

L'associazione di nutraceuticals con azione ipolipemizzante più studiata è proprio quest'ultima: RYR (3 mg di monacolina K) e berberina (500 mg).

Una metanalisi di 14 RCT con 3.159 soggetti, ha dimostrato che tale combinazione è in grado di ottimizzare i livelli plasmatici di:

- LDL-c portando ad un calo di 0,61 mmol/l, corrispondente ad una riduzione percentuale del 14,7%,
- HDL-c di 0,07 mmol/l (2,7 mg/dl),
- TG di 0,16 mmol/l (14,2 mg/dl)
- glucosio di 0,14 mmol/l (2,52 mg/dl).

RYR-berberina è stata testata in associazione anche con ezetimibe in pazienti intolleranti alle statine, raggiungendo una riduzione di LDL-c di circa il 35% e dei TG di circa il 25%.<sup>10</sup>

Di un certo interesse è anche la cooperazione tra riso rosso fermentato e steroli vegetali o estratti di carciofo. In un RCT in doppio cieco, controllo vs placebo, si è andati a valutare l'effetto di 800 mg fitosteroli coadiuvati con 5 mg di Monacolina K in 90 soggetti ipercolesterolemici: il gruppo trattato con i nutraceutici si è visto ridurre del 27% il valore di LDL-c del 19% l'ApoB.<sup>11</sup>

L'associazione di 200 mg di RYR, contenente 10 mg monacolina K, e 500 mg d'estratto di carciofo è stata valutata in un altro studio in doppio cieco incrociato, che ha coinvolto 30 adulti in prevenzione primaria di CVD. I soggetti arruolati sono stati trattati per 6 settimane con il composto nutraceutico o con il placebo, hanno poi trascorso 2 settimane di washout e, infine, è stata somministrata la terapia al gruppo che aveva ricevuto in precedenza il placebo. Il trattamento ha portato ad un miglioramento significativo delle LDL-c con un calo del 18,2%.<sup>11</sup>

Il CCSPS (China Coronary Secondary Prevention Study), guidato dall'Accademia cinese delle scienze mediche, è stato condotto su pazienti asiatici in prevenzione secondaria per determinare gli effetti clinici di un estratto parzialmente purificato di RYR.

Sono stati reclutati 4.870 pazienti con fascia di età compresa tra i 18 e i 70 anni, di cui l'82% uomini, con livelli medi di LDL-c di 129 mg/dl. Al gruppo ricevitore del nutraceutico sono stati somministrati 6 mg/die di Monacolina K per una media di 4,5 anni. Tale gruppo ha registrato un decremento del colesterolo circolante del 20% rispetto al placebo, inoltre è stato ridotto significativamente anche il rischio relativo (RR) di incorrere in eventi cardiovascolari e la mortalità totale, rispettivamente del 30% e del 33%.<sup>11</sup>

Nello studio CARE (Cholesterol And Recurrent Events) ad un calo di 42 mg/dl di LDL-c è stata associata una diminuzione del 24% del RRR (rischio relativo di riduzione) di incorrere in eventi coronarici. Nello studio LIPID (Intervento a lungo termine con Pravastatina nella Malattia Ischemica) ad una riduzione di 35 mg/dl di LDL-c è stato collegato un 23% in meno di rischio di incorrere in eventi coronarici, un calo del 24% per le morti coronariche e del 22% per la mortalità totale.<sup>11</sup>

Nello studio scandinavo sulla sopravvivenza in terapia con Simvastatina, a 66 mg/dl di riduzione delle LDL-c è stata associata una diminuzione del rischio di eventi coronarici del 34%, un -42% di morte coronarica e un -30% della mortalità totale. (Figura 20)

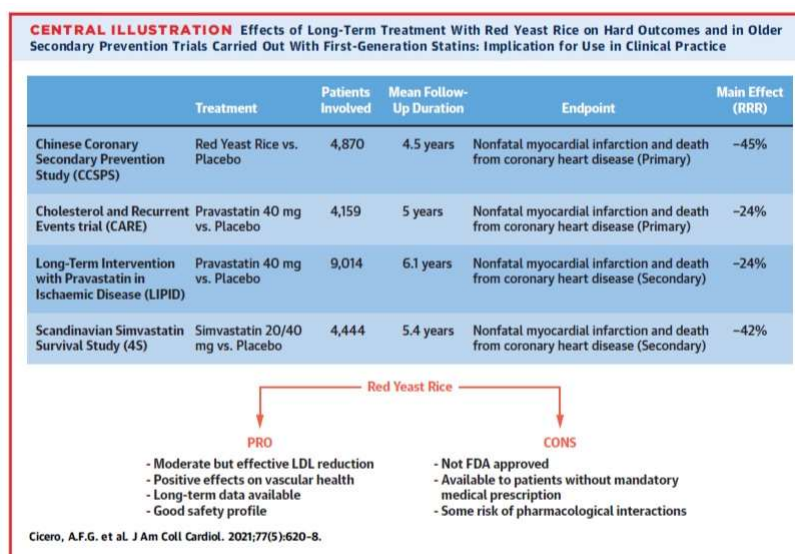


Figura 20. Effetti a lungo termine con trattamento con RYR

Questi dati sono stati ulteriormente confermati in un ampio studio di coorte osservazionale che ha confrontato 2.581 pazienti, a cui è stato somministrato il riso rosso fermentato in periodo preoperatorio, con 25.810 pazienti abbinati per età e sesso non in trattamento con RYR, i primi presentavano rischi minori di ictus (odds ratio [OR]: 0,66) e una rilevante diminuzione della mortalità ospedaliera a 30 giorni (OR: 0,37).<sup>11</sup>

È stato condotto anche uno studio che ha messo a confronto l'incidenza di eventi cardiovascolari in pazienti trattati con riso rosso fermentato e con placebo, nonostante gli ottimi risultati ottenuti con una riduzione del 45% degli eventi e del 30% delle morti per CVD, esso è stato chiuso perché considerato non etico. Non è infatti pensabile di trattare pazienti ipercolesterolemici, con già precedenti casi di CVD, con placebo e quindi, sostanzialmente, non trattarli affatto.

Gli apparenti migliori benefici ottenuti con la terapia a base di riso rosso fermentato rispetto a quelli raggiunti nei primi studi clinici con statine, possono essere spiegati sulla base delle differenze nel background terapeutico, genetico e dal fatto che i nutraceutici raramente contengono solo una monacolina, quindi, più molecole potrebbero contribuire agli esiti clinici finali.

Inoltre, è importante considerare la popolazione reclutata: la maggior parte delle prove sono state effettuate esclusivamente su soggetti cinesi, i quali per differenze genetiche intrinseche hanno un differente profilo farmacocinetico e farmacodinamico delle statine rispetto alle popolazioni occidentali, sostenendo la tesi che esiste un maggior effetto ipolipemizzante del RYR negli individui asiatici rispetto ad altre etnie, con il raggiungimento di livelli di LDL-c simili a quelli riscontrati nei pazienti in terapia con statine.

In generale, gli studi clinici sull'incidenza degli eventi cardiovascolari in pazienti in terapia con RYR sono stati principalmente condotti su soggetti cinesi ad alto rischio, questo rappresenta un rilevante limite all'implementazione clinica dei risultati conseguiti.

È stata perciò evidenziata la necessità di confermare quanto osservato negli individui cinesi anche in studi più ampi, prospettici e randomizzati coinvolgendo popolazioni di diverse aree geografiche.

La Società Europea di Cardiologia, le linee guida della Società Europea di Aterosclerosi e l'International Lipid Expert Panel suggeriscono l'uso dell'estratto di riso rosso fermentato nella gestione dell'ipercolesterolemia lieve in pazienti in prevenzione primaria.

Tuttavia, alcune preoccupazioni sono state recentemente sollevate per quanto riguarda la sicurezza di tale fitoterapico nei soggetti più fragili.

In primis la tollerabilità degli integratori dipende principalmente dalla qualità del prodotto assunto, dalla fragilità del paziente che lo assume e dal rischio di interazioni farmacologiche.

Nel complesso gli integratori a base di riso rosso sono generalmente sicuri e ben tollerati. Tuttavia, essi non sono regolamentati dalla Food and Drug Administration statunitense (FDA), ragion per cui, mancando un ente disciplinatorio, non sorprende le segnalazioni circa l'ampia variabilità quantitativa di Monacolina K nei preparati disponibili in commercio, incorrendo facilmente nel rischio di sovradosaggio o di mancato effetto nel caso opposto.



Inoltre, sono state sollevate numerose preoccupazioni per quanto riguarda la sicurezza di questi prodotti dopo la pubblicazione di alcuni case-report che dichiarano una loro ipotetica tossicità.

Durante la fermentazione del riso, uno dei rischi maggiori consiste nella formazione di un sottoprodotto intermedio potenzialmente pericoloso, la *citrinina*. In modelli preclinici, l'ingestione cronica di tale micotossina comporta nefrotossicità, portando ad iperplasia dell'epitelio tubulare, tossicità riproduttiva, malformazioni, tossicità embrionale, adenomi e tumori, tant'è che una dose di 50 mg/kg è stata associata all'insorgenza di cancro nel 100% degli animali testati.<sup>10</sup>

Per queste ragioni, sebbene non sia stato ancora riscontrato alcun effetto collaterale sull'uomo, l'European Food Safety Agency (EFSA) ha limitato l'assunzione di citrinina al giorno ad una quantità massima di 0,2 mg/kg di peso corporeo, per mantenere un buon profilo di sicurezza e nessun effetto nefrotossico. Tuttavia, negli integratori di RYR sul mercato sono stati rilevati livelli di citrinina anche superiori a 114 mg per capsula, dose ampiamente al di sopra del livello di sicurezza imposto, motivo per il quale è importante che il farmacista o il paziente stesso consideri solo prodotti certificati come privi di tale micotossina.

In generale, l'integratore senza citrinina contenente basse dosi di Monacolina K (3 mg), ha dimostrato di essere ben tollerato anche nei soggetti più fragili come bambini, anziani, pazienti con malattia renale cronica moderata o in terapia ormonale dopo il cancro al seno e quelli trattati con farmaci antiretrovirali.

Un'altra preoccupazione deriva dal costo derivante dal processo di purificazione volto ad ottenere un prodotto di alta qualità, costo che, in alcuni Paesi, risulta essere notevolmente superiore rispetto a quello d'acquisto di una generica statina a basso dosaggio e che potrebbe condurre ad un ridotto controllo dei metodi di buona preparazione GMP.

L'equivalenza tra la monacolina e la lovastatina fa sì che non solo i benefici ma anche gli effetti collaterali della statina vengano ereditati dal fitoterapico, in particolar modo il sintomo più accusato dai pazienti è la mialgia.

Il 10% dei soggetti in terapia col farmaco lo riportano e, di questi, il 30% interrompe il trattamento. In uno studio randomizzato sugli effetti avversi del RYR con contenuto di Monacolina K elevato, è stato registrato che 2 su 29 pazienti hanno continuato ad avvertire dolori muscolari evidenziati dall'incremento dei livelli di creatinichinasi (CPK), un marker biologico di infiammazione specifico.

È importante considerare che il polichetide viene ampiamente metabolizzato dal CYP3A4; quindi, inibitori o induttori di tale enzima possono provocare variazioni rilevanti nelle concentrazioni plasmatiche del principio attivo. Per questo, l'uso concomitante di inibitori del citocromo, come il succo di pompelmo e alcuni farmaci (ciclosporina, verapamil, antimicotici azolici, macrolidi, nefazodone, inibitori della proteasi dell'HIV) possono aumentare il rischio di miotossicità e, in casi eccezionali, rabdomiolisi, principalmente quando vengono assunte dosi corrispondenti a 10 mg/die o più alte.

Secondo un'ampia metanalisi di 53 RCT con 8.535 soggetti, comprendente 4.437 nel braccio di RYR e 4.303 nel braccio di controllo, la somministrazione di nutraceutico non è stata associata ad un aumentato rischio di problemi muscolari, al contrario del trattamento con statine.<sup>11</sup>

Nonostante sia il metabolismo che il meccanismo d'azione della lovastatina siano gli stessi della monacolina, per ragioni non ancora del tutto chiarite, il RYR sembra essere meglio tollerato dai soggetti intolleranti al farmaco, soprattutto quando le dosi giornaliere di principio attivo si aggirano tra i 3 e i 10 mg.

È importante sottolineare che in tutti questi studi, RYR è stato scelto e prescritto da medici e specialisti che hanno valutato in ogni paziente l'eventuale rischio per la sicurezza, al fine di non condurre sperimentazioni non etiche.

In sintesi, la somministrazione di prodotti certificati citrinin-free e contenenti basse dosi di Monacolina K, potrebbe essere presa in considerazione come un'efficace scelta a scopo ipolipemizzante in soggetti sani con ipercolesterolemia lieve. Tali nutraceutici potrebbero, inoltre, migliorare l'efficacia di altri fitoterapici ipolipemizzanti se presi in associazione.

Resta quindi da chiarire se gli estratti di fitoterapico sono una buona opportunità nel trattamento dell'ipercolesterolemia o se espongono i pazienti a rischi.

La Food and Drug Administration statunitense ha rilasciato nel 2007 e nel 2013 delle avvertenze circa l'uso di questi integratori, a causa della mancanza di prove significative sulla loro efficacia, sicurezza e, soprattutto, sull'assenza di metodi di preparazione standardizzati. In concomitanza a queste direttive, però, anche L'EFSA si è espressa, dando un parere positivo a sostegno delle indicazioni salutistiche del RYR sul controllo dei livelli di LDL-c plasmatici, suggerendo potenziali benefici associati ad una dose tra i 3 e i 10 mg.<sup>11</sup>

Basandosi sul meccanismo d'azione e sulle prove disponibili, si evince che il riso rosso fermentato è senza ombra di dubbio un efficace nutraceutico ad azione ipolipemizzante e protettiva a livello vascolare.

Recentemente gli studi si sono concentrati sull'analisi degli effetti a lungo termine derivanti dall'esposizione a vita di alti livelli di LDL-c per valutare il rischio individuale di eventi CVD. Sulla base delle evidenze pubblicate in letteratura negli ultimi cinque anni, è stato suggerito che più a lungo viene mantenuto basso il valore di LDL-c meglio è. In effetti, piccole differenze da 0,6 a 0,8 mmol/l, mantenute per un lungo periodo (da 12 a 15 anni), comporterebbero una riduzione rilevante del rischio di CVD.

I nutraceutici, in particolare il RYR, possono quindi essere immaginati come un sostegno ad uno stile di vita sano e dinamico portando ad ottimi risultati se assunti fin da giovani, mantenendo i livelli di LDL-c al di sotto della soglia sicura.

### **3.2 Resine sequestranti acidi biliari**

Le resine sequestranti acidi biliari sono caratterizzate da un alto peso molecolare, vengono somministrate per via orale prima dei pasti e agiscono esclusivamente a livello intestinale. Il loro meccanismo d'azione ipocolesterolemizzante segue due step fondamentali:

1. Inizialmente esse legano gli acidi biliari secreti a livello duodenale in seguito alla digestione, inibendone il riassorbimento;
2. il mancato recupero degli acidi nel circolo entero-epatico fa sì che ci sia un maggior consumo di colesterolo endogeno necessario per la loro sintesi, per ricavare la quota necessaria alla biosintesi degli acidi viene aumentata l'espressione dei recettori epatici per le LDL in modo da internalizzare il colesterolo ematico determinando una riduzione delle LDL-c.

Dopo ogni pasto si ha la secrezione biliare nell'intestino, gli acidi biliari che non vengono utilizzati per emulsionare i grassi in modo da poterli digerire, vengono riassorbiti a livello portale e fanno ritorno al fegato. C'è, quindi, un circolo entero-epatico fisiologico per il quale ad ogni pasto circa il 3% degli acidi viene utilizzato per l'emulsione dei lipidi e il restante 97% viene riassorbito. Le resine inibiscono tale processo e provocano un'espulsione massiccia di acidi biliari tramite le feci, determinando una consistente richiesta di colesterolo per la loro biosintesi e un aumento d'espressione di LDLR, il tutto si concretizza in un effetto ipocolesterolemizzante.

La colestiramina, ad esempio, è il sale cloruro di una resina basica scambiatrice di anioni, si tratta di una sostanza idrofila insolubile nell'acqua, non viene attaccata dagli enzimi digestivi rimanendo immodificata nel tratto gastroenterico.

I risultati con questa terapia sono modesti, si registra un abbassamento di circa il 15% delle LDL. Viene consigliata principalmente a pazienti che accusano importanti effetti collaterali al trattamento con statine.

### **3.3 Statine**

Le statine attualmente disponibili in commercio sono Pravastatina, Lovastatina, Simvastatina, Fluvastatina, Atorvastatina e Rosuvastatina. Il loro meccanismo d'azione è incentrato sull'inibizione competitiva dell'enzima idrossimetil-glutarilCoA reduttasi (HMG-CoA reduttasi), che regola la conversione dell'HMG-CoA a Mevalonato, bloccando la sintesi del colesterolo a livello degli epatociti. Ciò comporta una riduzione della sintesi del colesterolo endogeno ed un aumento "riflesso" d'espressione dei recettori per le LDL a livello delle cellule epatiche, con conseguente ulteriore riduzione del colesterolo plasmatico. Il fegato è, quindi, il sito di azione delle statine oltre che del loro metabolismo.

Tutte le statine sono somministrate nella loro forma attiva idrossiacida, ad eccezione della Simvastatina e della Lovastatina, le quali, essendo profarmaci, richiedono la biotrasformazione per esercitare effetti farmacologici.

In base alla loro solubilità, le statine vengono trasportate sistemicamente tramite diffusione passiva o attivamente assistite da trasportatori endogeni come i trasportatori dell'agente legante l'adenosina trifosfato (ABC) e i trasportatori di soluti (SLC).

Questa classe di farmaci vanta un'amplessima bibliografia che parte storicamente dallo studio 4S, in cui si è dimostrata una significativa riduzione di eventi coronarici, morte per CVD e mortalità totale in soggetti in prevenzione secondaria.

Un altro studio, tra i più citati, è lo JUPITER (Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C-Reactive Protein). Esso ha fornito dati molto interessanti circa gli "effetti pleiotropici" delle statine, cioè tutti quei benefici clinici indipendenti dalla riduzione della colesterolemia; in particolare è stato evidenziato che l'utilizzo di rosuvastatina 20 mg/die in soggetti in prevenzione primaria e senza storia di dislipidemia, ma con livelli elevati di PCR (Proteina C Reattiva), ha condotto ad una sostanziale riduzione dell'incidenza di infarto del miocardio, ictus ischemico, angina instabile ed interventi di rivascolarizzazione, tanto da essere sospeso dopo 1,9 anni di osservazione per poter introdurre nell'immediato la terapia in commercio, nonostante fosse inizialmente pianificato con un follow-up di 5 anni.

Le statine portano ad un decremento del 35-45% circa del colesterolo ematico, a volte anche di più, rendendole il farmaco di prima scelta nel trattamento dell'ipercolesterolemia. La terapia porta, però, anche ad un aumento dei livelli plasmatici di PCSK9, ciò suggerisce che riducendo l'attività della protein chinasi si possa aumentare l'efficacia delle statine nel ridurre LDL-c.

Sebbene generalmente considerate una classe di farmaci ben tollerata, sono anch'esse associate ad effetti avversi.

Una revisione sistematica ed una meta-analisi di studi randomizzati con oltre 90.000 partecipanti hanno dimostrato che le statine aumentano significativamente il rischio relativo e assoluto di miopatia, disfunzione renale e disfunzione epatica.<sup>12</sup>

La miotossicità indotta da statine e l'epatotossicità sono comuni e dose-dipendenti, con tassi di prevalenza che variano dal 7 al 30% e dal 2 al 5% rispettivamente.

La mialgia è responsabile della maggior parte dei casi di scarsa aderenza alla terapia da parte dei pazienti e spesso conduce alla sospensione dell'assunzione del farmaco. Essa si presenta come affaticamento, dolore muscolare, debolezza, crampi notturni o dolore ai tendini. Un'indagine retrospettiva su 45 pazienti con miopatia associata a statine ha dimostrato che il tempo di insorgenza dei sintomi è in media di 6 mesi, mentre il tempo di risoluzione dopo l'interruzione della statina è di circa 2 mesi.<sup>12</sup>

Solitamente i sintomi vengono inizialmente segnalati dai pazienti stessi e in seguito viene eseguita una valutazione oggettiva analizzando le concentrazioni plasmatiche di creatinichinasi.

Ad oggi sono diversi i meccanismi responsabili della miotossicità che sono stati proposti, tra cui i seguenti:

- È stato dimostrato che le statine riducono il contenuto di colesterolo nelle cellule del muscolo scheletrico, fattore che incide sulla stabilità della membrana cellulare. Poiché i canali e i trasportatori degli ioni vengono incorporati nella membrana, è stato suggerito che un cambiamento nella struttura della membrana stessa potrebbe disturbare la conduttanza ionica, compromettendo così l'eccitabilità della membrana muscolare dando crampi e dolori.
- È stato dimostrato che il trattamento con statine comporta la dissociazione della proteina legante FK506 dal recettore 1 della rianodina (RYR1), complesso fondamentale per la regolazione del calcio all'interno del reticolo sarcoplasmatico (SR). Ciò provoca un rilascio eccessivo di  $Ca^{2+}$  e diversi disturbi muscolari, tra cui miopatia e distrofia.

Poiché RYR1 è altresì associato alla segnalazione proapoptotica attraverso specie reattive di azoto e/o ossigeno, la sua destabilizzazione, indotta dall'uso delle statine, probabilmente è responsabile della tossicità che si sviluppa sui muscoli scheletrici.

- Polimorfismi genetici sugli enzimi adibiti al metabolismo delle statine possono esacerbare gli effetti e provocare, anche a basse dosi, un aumento della miopatia.

Nonostante gli effetti avversi collegati alla terapia, le statine rimangono comunque sia farmaci di prima scelta nel trattamento dell'ipercolesterolemia e tra i più venduti al mondo.

### **3.4 Ezetimibe**

L'ezetimibe appartiene alla classe dei 2-azetidioni ed è un inibitore selettivo dell'assorbimento del colesterolo alimentare, esso interagisce con il trasportatore delle LDL a livello dell'orletto a spazzola della mucosa intestinale.

Nello specifico, la proteina NPC1L1 (Niemann-Pick C1-like 1) è responsabile della captazione intestinale del colesterolo e, una volta internalizzato nell'enterocita, delle transferasi lo esterificano di modo che possa andare a costituire le lipoproteine circolanti. L'ezetimibe subisce un processo di coniugazione con l'acido glucuronico a livello dell'intestino e del fegato, tale biotrasformazione è necessaria per l'ottenimento del composto attivo, il quale lega il trasportatore NPC1L1 inibendo l'assorbimento delle LDL. L'efficacia del farmaco in monoterapia è alquanto modesta, si registra una riduzione media del 10-15% del colesterolo totale. È importante notare, però, che diminuendo la quota esogena aumenterà il fabbisogno di LDL dell'epatocita che, di riflesso, incrementerà la sintesi ex-novo e l'espressione di LDLR sulla superficie cellulare.

Le evidenze riportate in letteratura portano alla conclusione che il trattamento con l'associazione ezetimibe + statina sembra apportare significativi miglioramenti al profilo lipidico rispetto alla monoterapia con statina, ezetimibe o altri farmaci ipocolesterolemizzanti; in modo da un lato bloccare l'assorbimento del colesterolo esogeno e dall'altro bloccarne la biosintesi.

Questa cooperazione dei due farmaci conduce ad una diminuzione massiccia del 50-60% delle LDL, tant'è che è utile anche nei casi di ipercolesterolemia familiare.

### **3.5 Anticorpi monoclonali anti-PCSK9**

Gli anticorpi monoclonali sono proteine caratterizzate da un'elevata specificità nei confronti di un determinato antigene, essi vengono prodotti grazie alla tecnica del DNA ricombinante dell'ingegneria genetica a partire da un tipo di cellula immunitaria.

Gli anticorpi endogeni, o immunoglobuline, sono glicoproteine prodotte dai linfociti B del sistema immunitario umorale. Tali proteine sono in grado di riconoscere e legarsi in maniera specifica ad altri tipi di sostanze definite "antigeni", i quali possono essere di varia natura, ad esempio, proteica, polisaccaridica, lipidica, ecc...

La funzione degli anticorpi è quella di riconoscere e neutralizzare gli agenti estranei e/o patogeni, come, ad esempio, virus, batteri o tossine; ciò è possibile grazie alla particolare

struttura di queste molecole.

Come esemplificato in figura 21, le immunoglobuline sono proteine globulari dotate di una particolare conformazione a "Y": all'interno di questa struttura proteica vi sono una regione detta "costante" e delle regioni "variabili", corrispondenti alle braccia della "Y". È proprio a livello di quest'ultime che si trovano i siti di legame specifici per l'antigene.

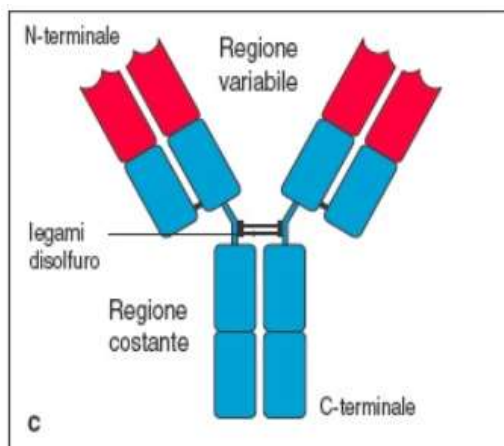


Figura 21. Rappresentazione schematica della struttura a "Y" di una Ig

Ogni linfocita B è in grado di produrre milioni di anticorpi, a loro volta capaci di riconoscere diversi tipi di antigeni (anticorpi policlonali).

Una volta che l'anticorpo si lega all'antigene per cui è specifico, l'anticorpo stesso si attiva e dà origine alla risposta immunitaria che porterà all'eliminazione dell'agente estraneo.

Gli anticorpi monoclonali agiscono con il medesimo meccanismo d'azione appena descritto, essi possiedono un'affinità altamente specifica per un determinato tipo di antigene e vi si legano, consentendo di ottenere una risposta immunitaria nei confronti di quella tossina, proteina, mediatore chimico, cellula maligna o agente patogeno che costituisce il target della terapia.

In altri termini, il meccanismo dei monoclonali è sovrapponibile a quello degli anticorpi policlonali, ma i primi sono in grado di riconoscere e legarsi in maniera selettiva solo ad una tipologia di antigeni ben precisa.

I mAbs impiegati in terapia sono molti e possono essere classificati in diversi modi, ad esempio, considerando l'origine è possibile distinguerne quattro tipologie:

- I. **Murini**, ossia anticorpi monoclonali interamente derivati dalle cellule di topo. Sono riconoscibili dal nome in quanto terminano con il suffisso *-omab*.
- II. **Chimerici**, si tratta di mAbs realizzati attraverso tecniche di biologia molecolare che consentono di sostituire la regione costante dell'anticorpo ottenuto da cellule di topo con la corrispondente porzione di origine umana. Tali anticorpi, quindi, contengono una frazione murina e una umana. Si riconoscono dal suffisso *-ximab*.
- III. **Umanizzati**, sono anticorpi monoclonali che derivano principalmente da cellule umane, ad eccezione della parte che si lega all'antigene specifico. Riconoscibili dai nomi che terminano con il suffisso *-zumab*.
- IV. **Umani**, sono anticorpi interamente originati da cellule umane. Il loro suffisso è *-umab*.

Oltre alla loro origine è possibile suddividere i mAbs in funzione del legame o meno con altre molecole. Più precisamente:

- Anticorpi monoclonali **nudi**, ossia non coniugati ad altre molecole;
- Anticorpi monoclonali **coniugati** a farmaci o a isotopi radioattivi.

Con la coniugazione di uno o più farmaci agli anticorpi è possibile direzionare con estrema precisione e accuratezza quel principio attivo verso il target di interesse, evitando di coinvolgere anche altri distretti dell'organismo.

In questo modo, si possono potenzialmente ridurre gli effetti indesiderati ed aumentare l'efficacia terapeutica.

La coniugazione con isotopi radioattivi, invece, è una tecnica che viene sfruttata soprattutto nella terapia antitumorale, più precisamente in questi casi si parla di radioimmunoterapia.

Come accennato, gli usi degli anticorpi monoclonali sono molteplici e comprendono sia l'ambito diagnostico che quello terapeutico.

Possono essere impiegati per accertare la presenza di un determinato antigene e, se necessario, decretarne la quantità. Trovano riscontro nell'individuazione di agenti batterici o virali, particolari tipi di proteine o cellule tumorali.

Risulta chiaro come queste molecole possano essere sfruttate in laboratori clinici per la diagnosi di patologie, ma non solo, infatti, possono trovare impiego anche nei cosiddetti kit diagnostici d'uso domestico, quali, ad esempio, i ben noti test di gravidanza, test dell'ovulazione e il recentissimo test antigenico rapido per COVID-19.

Gli anticorpi monoclonali a fini terapeutici hanno diversi target d'azione come diversi sono i quadri clinici in cui vengono adottati. Esistono mAbs ad azione antinfiammatoria in cui uno tra i bersagli antigenici più comuni è IL-1 $\beta$  umana, questa è una citochina pro-infiammatoria coinvolta in molti processi patologici e, in particolare, nei fenomeni di progressione dell'aterosclerosi. L'attività di Canakinumab, un mAb che si lega a tale interleuchina e neutralizza il suo legame con i suoi recettori, è stata confrontata a quella con placebo nello studio CANTOS: esso comprendeva 10.061 pazienti con fenotipo infiammatorio, definito dal test della proteina C-reattiva (PCR) con valori maggiori o uguali a 2 mg/l, e che avevano già avuto un infarto del miocardio. È stata registrata una diminuzione degli eventi clinici (infarto del miocardio, rivascolarizzazione, arresto cardiaco) proporzionale alla riduzione della PCR nei soggetti che avevano ricevuto una dose di 150 mg di anticorpo.<sup>13</sup>

Altri mAbs vengono usati nel trattamento dell'asma allergica direzionati verso le IgE. Quelli ad azione immunosoppressiva vengono adoperati per evitare il rigetto nei casi di trapianto d'organo e sono diretti contro linfociti B e T e molti altri ancora tra cui quelli impiegati nella terapia dell'ipercolesterolemia.

Quest'ultimi sono farmaci biologici di tipo immunitario che non rientrano nelle terapie standard, la loro funzione è quella di inibire l'attività della proproteina convertasi subtilisina/kesina tipo 9.

La PCSK9, una volta secreta dall'epatocita, viene rilasciata per esocitosi e si lega al recettore delle LDL inducendone la degradazione e diminuendo, di conseguenza, la quantità di colesterolo assorbita a livello epatico, mantenendo elevati i valori delle LDL circolanti nel sangue.

Bloccando l'attività dell'enzima con un opportuno anticorpo si ottiene un riciclo più rapido del recettore, che verrà esposto di continuo sulla superficie cellulare ed una maggiore capacità di internalizzare LDL riducendo la colesterolemia.

La terapia con mAbs viene somministrata per infusione endovenosa o tramite iniezione sottocutanea ogni due settimane circa da personale sanitario specializzato, inoltre, richiede un periodo di osservazione opportuno, nota dolente del trattamento in quanto diventa oneroso ed impegnativo per il paziente recarsi in ospedale così spesso.

Si è dimostrata altamente efficace nel ridurre i livelli di colesterolo LDL fino al 60%, indipendentemente dai valori di partenza e dall'eventuale terapia ipolipemizzante in atto. Gli anticorpi monoclonali anti-PCSK9 vengono frequentemente adottati da soggetti affetti da ipercolesterolemia familiare omozigote, eterozigote o in prevenzione secondaria in pazienti con una patologia aterosclerotica accertata al fine di ridurre il rischio di infarto miocardico, ictus ischemico o arteriopatia.

Evolocumab è stato il primo a mostrare una diminuzione degli eventi clinici in uno studio di fase III (studio FOURIER) che ha incluso 27.564 pazienti in prevenzione secondaria di aterosclerosi sintomatica. Anche Alirocumab, con lo studio ODYSSEY OUTCOMES, ha dimostrato una riduzione degli eventi clinici in 18.924 pazienti che avevano già sperimentato un precedente infarto miocardico.<sup>13</sup>

Entrambi gli anticorpi vengono somministrati per via sottocutanea ogni 15 giorni, dopo averne dimostrato l'efficacia e la loro eccellente tolleranza, hanno ottenuto indicazioni terapeutiche in diversi scenari clinici dall'Agenzia Europea per i medicinali. Evolocumab (Repatha®), ad esempio, è consigliato nella prevenzione primaria nei casi di ipercolesterolemia familiare omozigote ed eterozigote dai 12 anni in su, anche in combinazione con altri agenti ipolipemizzanti.

### **3.6 Aferesi**

La terapia farmacologica per FH comporta l'aumento d'espressione dei recettori per le LDL nel fegato; in pazienti affetti dalla patologia in omozigosi, però, questo approccio risulta quasi del tutto inefficace in quanto i recettori non hanno attività. Inoltre, ci sono seri casi di FH negli eterozigoti in cui l'aterosclerosi progredisce e non basta la sola terapia farmacologica per mantenerla sotto controllo.

A causa di tali limiti e nelle condizioni cliniche più drastiche, è stata sviluppata e viene impiegata l'aferesi delle lipoproteine come tecnica di emoperfusione per rimuovere le LDL dal sangue e restituire al paziente la quota ematica "pulita". Il problema di questa procedura, però, è che comporta un grande onere per il paziente, il quale deve recarsi in ospedale ogni 1-2 settimane per 3-5 ore a volta, ragion per cui viene adottata solo nei casi più gravi.

I pazienti affetti da FH in omozigosi nella maggior parte dei casi vanno incontro a morte per cause cardiovascolari all'età di 30 anni se non si sottopongono a terapia di aferesi lipoproteica, purtroppo però tale metodica può solo ritardare il progresso dell'aterosclerosi ma non fermarlo completamente.

D'altra parte, l'ingente effetto riduttivo di LDL-c con le terapie anticorpali anti-PCSK9 ha consentito di diminuire, se non interrompere del tutto, il trattamento con aferesi.

### **3.7 Oligonucleotidi antisenso**

Come spiegato in precedenza, la PCSK9 induce la degradazione dei recettori epatici per le LDL sia per via intracellulare sia extracellulare, con l'impiego di anticorpi monoclonali, però, si prende di mira solo quest'ultima via.

Gli oligonucleotidi antisenso, detti anche ASO (dall'inglese AntiSense Oligonucleotides), permettono l'inibizione di entrambe le vie perché vanno a ridurre direttamente a monte i livelli di mRNA e quindi dell'espressione della PCSK9.

Essi consistono in brevi sequenze nucleotidiche complementari ad uno specifico mRNA a cui si legano e ne impediscono la traduzione.

Tuttavia, i primi ASO testati, ovvero il 2'-O-metossietil-fosforotioato e gli oligonucleotidi antisenso dell'acido nucleico bloccato (LNA) contro PCSK9, hanno avuto un inizio difficile.<sup>14</sup> Anche se risultati promettenti sono stati ottenuti in topi e scimmie, entrambi gli studi clinici sono cessati in fase I.

Un primo studio clinico sull'RNA interferente (siRNA) diretto contro la PCSK9 ha valutato l'efficacia nel ridurre i livelli di proteina. Lo studio ha previsto la randomizzazione, in singolo cieco, controllo vs placebo, di volontari adulti sani con valori di LDL-c sierici di  $\geq 3$  mmol/L o superiore. I dati hanno dimostrato che ad una dose di 0,4 mg/kg questo



trattamento ha prodotto in media una riduzione del 70% della proteina plasmatica PCSK9 circolante e del 40% delle LDL-c rispetto al placebo.<sup>14</sup>

In conclusione, si è visto che gli anticorpi monoclonali sembrano bloccare la proteina libera in circolazione quasi al 100%, mentre l'approccio con il siRNA lascia ancora  $\approx 30\%$  di PCSK9 in circolazione, suggerendo un'efficacia limitata di quest'ultimo.

Anche se un diretto confronto di questo approccio con quello con mAbs deve ancora essere testato nell'uomo, l'efficacia riduttiva del colesterolo plasmatico osservata con siRNA ( $\approx 40\%$ ) non è ancora migliore dei risultati raggiunti con gli anticorpi ( $\approx 50/70\%$ ).

È quindi possibile che la via intracellulare epatica fornisca un contributo relativamente minore all'attività complessiva di PCSK9 su LDLR rispetto alla via extracellulare.



#### 4. VERSO LA TERAPIA GENICA: INCLISIRAN

Nella scelta della terapia ipocolesterolemizzante più opportuna per un determinato paziente, i medici fanno riferimento a delle linee guida ufficiali.

Come si evince dalla figura 22.A, in un primo momento si definisce se il paziente in questione necessita di un trattamento farmacologico o meno in base al valore di LDL-c presente nell'organismo, in entrambi i casi viene comunque consigliato uno stile di vita sano accompagnato da una dieta equilibrata.

Se i livelli di colesterolo sono oltre la soglia di sicurezza, si inizia subito con la somministrazione di statine, farmaco di prima scelta, e vengono prescritti controlli cadenzati per tenere monitorati i valori di LDL. Nel caso in cui la terapia non sia sufficiente a diminuire lo score, lo step successivo consiste nell'aggiunta di ezetimibe in associazione alla statina, in modo tale da agire su due fronti: inibendo, da un lato, la sintesi endogena e ostacolando, dall'altro lato, l'assorbimento intestinale, ottenendo un effetto sinergico potenziato.

Tuttavia, esistono casi in cui neanche questa cooperazione risulta sufficiente a ridurre entro il limite di sicurezza i livelli di LDL-c, in queste evenienze vengono impiegati gli anticorpi monoclonali anti-PCSK9, somministrati in ospedale da personale sanitario ogni 2 settimane circa.

Proprio in questo step finale delle linee guida riguardanti il trattamento dell'ipercolesterolemia, successivamente al trattamento con mAbs, può essere inserito il ricorso alla terapia genica con Inclisiran.

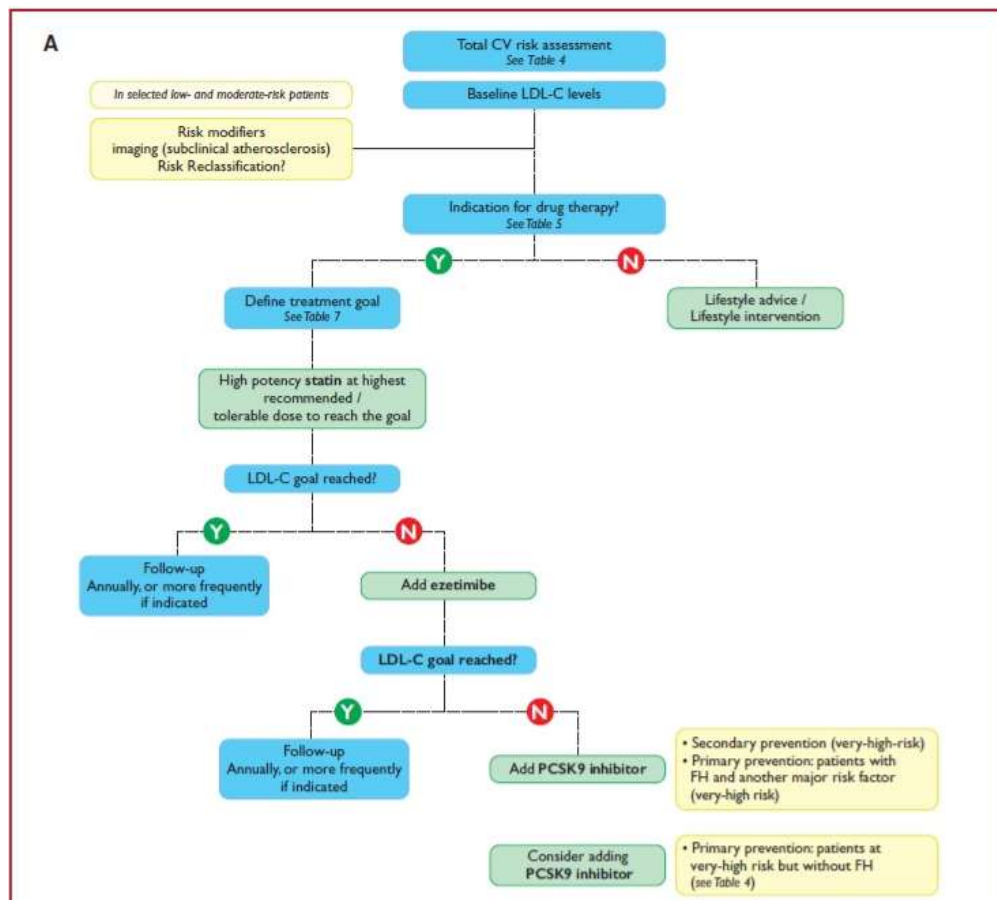


Figura 22.A: Linee guida per il trattamento dell'ipercolesterolemia

Sempre nelle linee guida ufficiali, figura 22.B, vengono illustrate anche alcune categorie di rischio con i relativi valori di LDL-c ammessi, i quali sono stati assegnati in base al quadro clinico presentato dal paziente: più cresce il rischio cardiovascolare più basso sarà il limite concesso, allo scopo di diminuire l'incidenza di eventi CVD.

La classificazione comprende 4 gradi di rischio:

1. Basso: Uno SCORE (Systematic Coronary Risk Estimation) inferiore all'1%, per questi pazienti il rischio di problemi coronarici è relativamente basso e, quindi, il valore di LDL massimo ammesso è di 116 mg/dl;
2. Moderato:  $1\% < \text{SCORE} < 5\%$ , pazienti giovani con presenza di diabete di tipo 1 al di sotto dei 35 anni o di tipo 2 prima dei 50 anni, in questo caso il rischio aterosclerotico aumenta e, di conseguenza, diminuisce il limite di LDL-c massimo che risulta essere fissato a 100 mg/dl;
3. Alto:  $5\% < \text{SCORE} < 10\%$ , TC (colesterolo totale) sopra i 310 mg/dl, LDL-c  $> 190$  mg/dl, diabete, FH e CKD (Chronic Kidney Disease) moderata. Tale quadro comporta un LDL-c max di 70 mg/dl;
4. Molto Alto:  $\text{SCORE} > 10\%$ , FH, aterosclerosi, compromissione renale severa, diabete con i relativi possibili danni multiorgano. In questa evenienza così drastica il limite di LDL-c massimo è posto a 55 mg/dl.

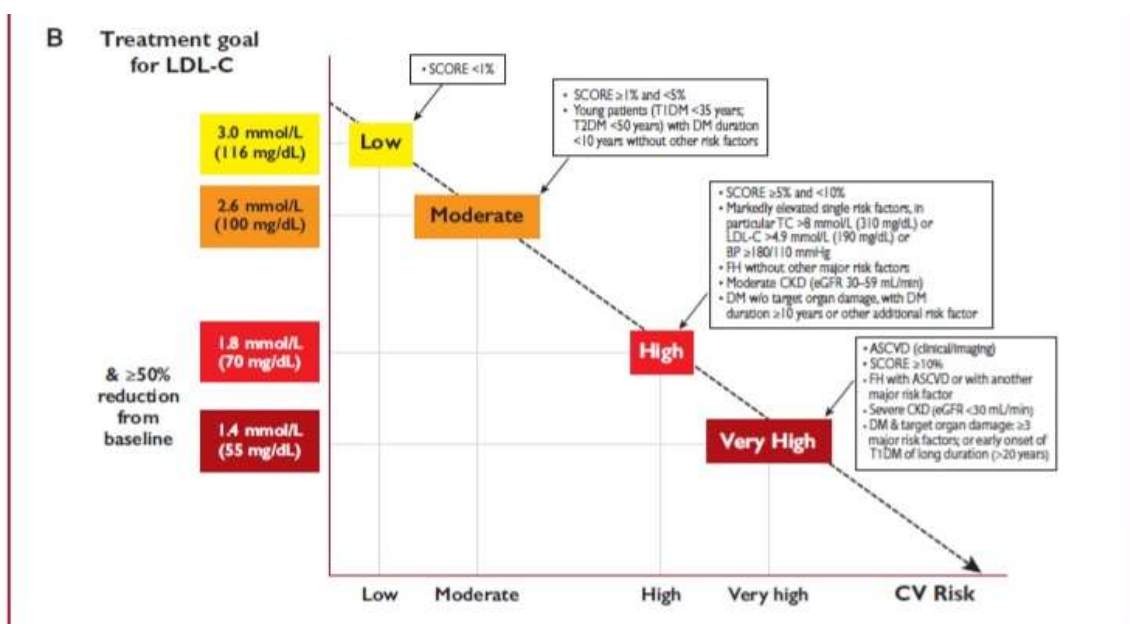


Figura 22.B: Categorie di rischio con i rispettivi valori ammessi di LDL-c

Nel corso degli anni i risultati di studi prospettici e sequenziamento genetico hanno condotto all'identificazione di nuovi bersagli terapeutici per il controllo del metabolismo lipidico, con lo scopo di ottenere terapie sempre più performanti e con una migliore compliance da parte del paziente.

#### **4.1 Terapia genica**

Nel nucleo delle cellule il codice genetico presente sul DNA viene inizialmente trascritto in un frammento di RNA definito RNA messaggero (mRNA), esso viene successivamente decodificato nel citoplasma e tradotto in proteine per opera dei ribosomi.

Il silenziamento genico è un meccanismo post-trascrizionale che consiste nella capacità di specifici frammenti di RNA a doppio filamento, non codificanti e ottenuti con l'ingegneria genetica, di prevenire l'espressione proteica di un determinato gene. Attraverso l'appaiamento di determinate sequenze oligonucleotidiche "antisenso" con un mRNA bersaglio ("senso"), viene indotta la degradazione di quest'ultimo e si inibisce la sintesi della proteina associata. Questo processo previene, quindi, la traduzione dell'mRNA nella proteina corrispondente.

Attualmente esistono due strategie di silenziamento genico che sono state sviluppate a fini farmacologici:

- oligonucleotidi antisenso (ASO)
- piccoli RNA interferenti (siRNA, small interfering RNA)

Gli ASO sono costituiti da oligonucleotidi, tipicamente 5-25 paia di basi, a singolo filamento; essi sono progettati per formare ibridi con mRNA target a loro complementari e regolare l'espressione genica mediante il coinvolgimento della endoribonucleasi RNasi H1. Quest'ultima si lega all'eterodimero DNA-RNA, portando alla degradazione selettiva del solo filamento di RNA, mentre quello di DNA rimane integro e può interagire con altri mRNA target.

Gli ASO possono agire anche in assenza di meccanismi degradativi, semplicemente accoppiandosi all'mRNA target e bloccandone la traduzione (Figura 23).

Diversamente, i siRNA sono molecole costituite da circa 20-30 nucleotidi che impediscono la traduzione intracellulare dell'mRNA in proteine specifiche. Questo silenziamento avviene mediante la formazione del complesso denominato RISC (RNA-induced silencing complex), il quale è in grado di scindere il filamento di mRNA target, riducendo, di conseguenza, anche l'espressione della proteina da esso codificata.

I siRNA sono composti da due filamenti: uno è la guida, contenente le informazioni per il riconoscimento dell'mRNA bersaglio; l'altro è il "passenger", utile per l'interazione con il complesso RISC.

Una volta raggiunto il citoplasma i due filamenti si separano e la guida viene caricata nel RISC, mentre il passenger viene rimosso per degradazione. Il RISC utilizza il filamento guida per identificare le sequenze di mRNA complementari e creare un complesso ibridato, a questo punto il filamento target viene degradato ad opera di Argonaute 2 (Ago2), una endonucleasi facente parte del complesso RISC.

Il risultato finale è l'inibizione della sintesi della proteina codificata dall'mRNA bersaglio. È importante sottolineare che il filamento di siRNA rimane protetto dal complesso RISC a lungo, creando una condizione per cui può silenziare l'espressione genica anche in un momento successivo, appaiandosi ad altri mRNA bersaglio. (Figura 23)

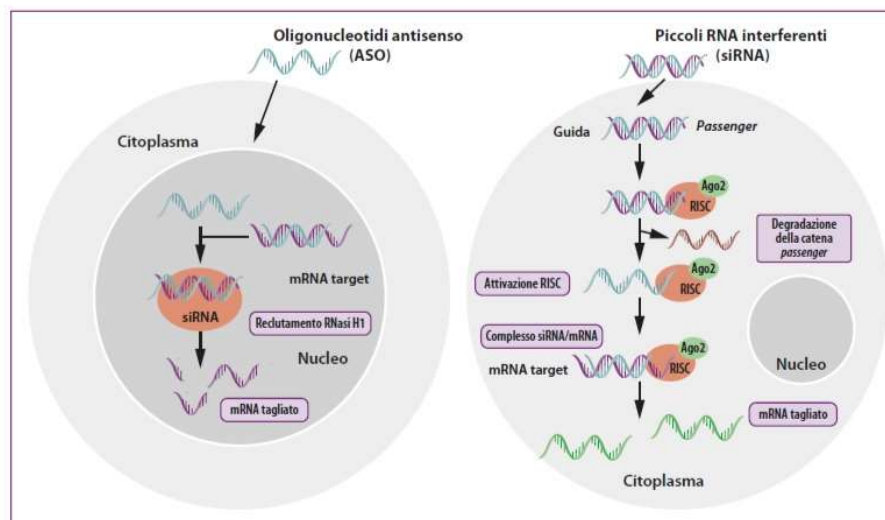


Figura 23. Meccanismo d'azione ASO e siRNA

Queste classi di molecole hanno richiesto molti anni di ricerca e modificazioni chimiche per renderle sempre più biodisponibili e ben tollerate.

Negli ASO di prima generazione l'aggiunta del fosforotiato ha determinato una riduzione dell'idrofilia ed una maggiore resistenza all'azione degradativa operata dalle nucleasi nei loro confronti, migliorando il profilo farmacocinetico. Tuttavia, l'interazione con le proteine plasmatiche determinava l'attivazione del sistema del complemento, l'induzione piastrinica e la stimolazione del sistema immunitario con una conseguente maggior incidenza di vasculiti e glomerulonefriti.

Negli ASO di seconda generazione è stata, perciò, prevista la sostituzione dell'idrossile in posizione 2' dello zucchero con residui di 2'-O-metile (2'-OMe), 2'-O-metossietile (2'-MOE) e 2'-fluoro (2'-F). Queste modifiche hanno conferito agli oligonucleotidi antisenso un'elevata resistenza alla nucleasi, una maggiore affinità di legame agli mRNA target, una riduzione della tossicità e una variazione della lipofilia, favorendone la diffusione attraverso la membrana plasmatica delle cellule e prolungandone l'emivita plasmatica.

Poiché sia gli ASO sia i siRNA mostrano tipicamente un'ampia distribuzione, specialmente a livello degli organi maggiormente irrorati quali rene e fegato, sono state studiate e sviluppate ulteriori modifiche chimiche per veicolare in maniera selettiva queste molecole al distretto epatico.

La coniugazione con la N-acetilgalattosamina (GalNAc) è l'espedito più utilizzato, soprattutto nelle terapie per il trattamento delle iperlipoproteinemie. GalNAc si lega al recettore dell'asialoglicoproteina (ASGPR), espresso esclusivamente dagli epatociti, mediante questo legame gli ASO e i siRNA vengono interiorizzati selettivamente nell'epatocita, dove il complesso si dissocia consentendo il ricircolo del recettore ASGPR in membrana e la liberazione dell'ASO e dei siRNA nel compartimento intracellulare.

## **4.2 Anti-ApoB**

La prima applicazione di terapia genica per il controllo delle dislipidemie è imputabile allo sviluppo di oligonucleotidi antisenso anti-ApoB per il trattamento di pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare omozigote (HoFH).

Infatti, numerose evidenze cliniche ed epidemiologiche hanno stabilito che le lipoproteine contenenti l'apolipoproteina B, quali le LDL ricche di colesterolo e le lipoproteine a bassissima densità (VLDL), sono direttamente implicate nello sviluppo della patologia aterosclerotica ed elevati livelli di ApoB rappresentano un fattore di rischio cardiovascolare. Tale osservazione ha suggerito, quindi, che l'inibizione dell'apolipoproteina possa costituire una possibile strategia terapeutica per il trattamento dell'ipercolesterolemia.

A questo scopo è stato sviluppato e approvato negli Stati Uniti Mipomersen: un oligonucleotide antisenso di seconda generazione, fosforotioato, costituito da 20 nucleotidi, contenente gruppi -OMe che gli conferiscono un'elevata resistenza alle esonucleasi. Esso lega l'mRNA che codifica per ApoB, inibendone la sintesi ed impedendo la formazione anche di tutte le lipoproteine pro-aterogene contenenti ApoB, comprese le LDL. Dato che in questo caso il meccanismo di riduzione dei livelli di colesterolo circolante è indipendente dal recettore per le LDL, il farmaco risulta efficace anche nei pazienti con FH che presentano mutazioni sul gene che codifica per LDLR associate ad una mancanza totale, o ad una riduzione importante, dell'attività di questo recettore.

La posologia ha previsto una somministrazione sottocutanea settimanale di 200 mg ed ha determinato:

- -26,8% di ApoB
- -21,2% di colesterolo totale
- -24,5% di LDL-c
- -31,1% di Lp(a)
- +15,1% di HDL

Per quanto riguarda la sicurezza i principali effetti avversi segnalati sono stati: reazioni nel sito di inoculo, sintomi simil influenzali, nausea, mal di testa ma anche aumento delle transaminasi, in particolare l'alanina aminotransferasi (ALT), e steatosi epatica.<sup>15</sup>

Per queste ragioni Mipomersen non è mai stato approvato dall'EMA e, più recentemente nel 2018, la sua commercializzazione è stata del tutto interrotta.

## **4.3 Anti-ANGPTL3**

ANGPTL3 (Angiopietin-like 3) è un enzima che, inibendo la lipasi lipoproteica prodotta dal fegato, scompone i trigliceridi plasmatici a livello dei capillari del muscolo scheletrico e del tessuto adiposo aumentandone la concentrazione plasmatica.

Il ruolo di ANGPTL3 nel metabolismo del colesterolo e dei trigliceridi è stato messo in luce da studi genetici: in soggetti portatori di varianti con perdita di funzionalità associata all'enzima si sono osservati livelli ridotti di trigliceridi, di LDL-c e HDL-c.

Il silenziamento genico di ANGPTL3 è associato ad una riduzione della secrezione di ApoB portando ad un aumento della captazione e degradazione delle LDL e delle lipoproteine a bassissima densità (VLDL), ovvero ricche in trigliceridi. È proprio questa

caratteristica a rendere ANGPTL3 un bersaglio farmacologico importante per i pazienti affetti da HoFH.

L'emivita calcolata è di circa 3-5 settimane. La somministrazione in dosi multiple di anti-ANGPTL3 ha determinato, rispetto al gruppo placebo, una riduzione di:

- TG (tra -33,2% e -63,1%),
- LDL-c (tra -1,3% e -32,9%),
- VLDL-c (tra -27,9% e -60%),
- TC (non HDL-c) (tra -10% e -36,6%),
- ApoB (tra -3,4% e -25,7%),
- ApoC-III (tra -18,9% e -58,8%)<sup>1</sup>.

#### 4.4 Inclisiran

Un altro bersaglio di rilevante importanza clinica nel trattamento dell'ipercolesterolemia è la proteina PCSK9, per la quale sono stati sviluppati numerosi farmaci biotecnologici, quali anticorpi monoclonali e siRNA. Un recente appartenente a quest'ultima categoria è Inclisiran: un oligonucleotide sintetico di RNA a doppio filamento realizzato con nucleotidi modificati per aumentarne l'emivita e coniugato con tre molecole di N-acetilgalattosamina (GalNAc), che, attraverso il legame ai recettori ASGPR abbondantemente espressi nel fegato, favoriscono la distribuzione del farmaco negli epatociti con elevata selettività.

Il siRNA è disegnato per legarsi alla porzione 3'UTR dell'mRNA di PCSK9 allo scopo di impedirne la traduzione, aumentando il riciclo dei LDLR e la diminuzione dei livelli plasmatici di colesterolo LDL.

##### Struttura chimica

Da un punto di vista strutturale (Figura 24), Inclisiran è un complesso sintetizzato chimicamente che si compone di due catene, una di supporto al passaggio intracellulare (passenger) e l'altra in grado di riconoscere e silenziare la sequenza genica target (guida). Esso è costituito da un 2'-deossi, undici 2'-fluoro e trentadue 2'-O-metil nucleotidi, infatti, come discusso precedentemente, i siRNA non modificati sono altamente instabili a causa dell'elevata suscettibilità alla degradazione dei ribonucleotidi alle esonucleasi e all'endonucleasi.

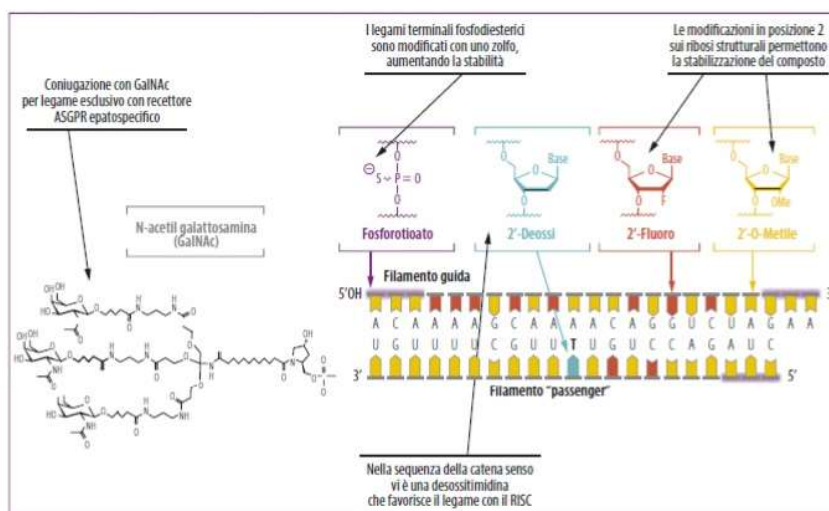


Figura 24. Struttura chimica di Inclisiran



La combinazione del 2'-fluoro e le modifiche 2'-O-metile portano ad una stabilizzazione del composto senza comprometterne la capacità di legarsi al RISC, il complesso proteico responsabile della trascrizione cellulare.

I legami fosfodiesterici terminali sono modificati con fosforotiati fornendo un'ulteriore resistenza alla degradazione operata dell'esonucleasi e, potenzialmente, contribuiscono all'internalizzazione cellulare del composto.

Nella sequenza della catena "senso" vi è una desossitimidina in una posizione corrispondente al sito di taglio del RISC, la presenza di questo nucleoside consente un miglior "caricamento" del siRNA da parte del complesso ed accelera la degradazione del filamento "passenger" rilasciato dal RISC.

La porzione 3' del filamento "passenger" (non attivo) è coniugata a GalNAc, ciò consente ad Inclisiran di essere riconosciuto in maniera specifica e selettiva dal recettore dell'asialoglicoproteina (ASGPR) espresso quasi esclusivamente sulla superficie degli epatociti, in questo modo non viene intaccata l'attività della PCSK9 in altri siti dell'organismo.

Quindi, sebbene il GalNAc sia importante per conferire la selettività d'azione di Inclisiran a livello epatico, la struttura e le modificazioni chimiche dell'oligonucleotide svolgono un ruolo essenziale nell'efficacia e nella prolungata attività del farmaco.

#### Meccanismo d'azione

Il meccanismo d'azione di Inclisiran è simile a quello di tutti gli altri siRNA: il suo legame al RISC promuove la degradazione dell'mRNA di PCSK9 impedendo la sintesi della relativa proteina, con conseguente aumento del numero di recettori per le LDL a livello epatico (Figura 25).

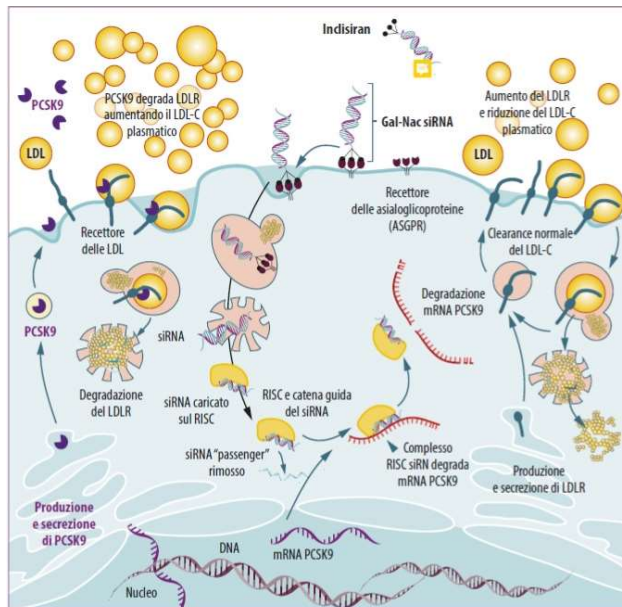


Figura 25. Meccanismo d'azione di Inclisiran

Una volta somministrato per via sottocutanea, Inclisiran viene captato dagli epatociti e solo una frazione relativamente piccola di farmaco diventa biologicamente attiva e viene caricata immediatamente nel RISC, dove avrà un'emivita di settimane. La restante parte di siRNA viene sequestrata a livello del citoplasma cellulare negli endosomi, che fungono da deposito intracellulare di farmaco e dai quali viene poi rilasciato lentamente.

Questo particolare meccanismo conferisce all'oligonucleotide una lunga attività d'azione indipendentemente dalla sua presenza nel circolo sistemico.

### Farmacocinetica di Inclisiran

Inclisiran viene somministrato tramite iniezione sottocutanea nell'addome, nel braccio o nella coscia utilizzando una siringa preriempita, nella quale ogni dose da 300 mg contiene precisamente 284 mg di farmaco.

Il regime posologico, illustrato in figura 26, prevede una prima somministrazione, seguita da una seconda a distanza di 3 mesi, per poi proseguire con una dose di mantenimento ogni 6 mesi. Questa lunga capacità d'azione del farmaco nel tempo è un'altra proprietà di spicco di Inclisiran, infatti, a differenza degli anticorpi monoclonali, i quali necessitano di ripetute somministrazioni ogni 2 settimane circa, con il siRNA si migliora di molto la compliance del paziente e l'aderenza alla terapia, con la speranza di promuovere a valle una riduzione del rischio CVD.

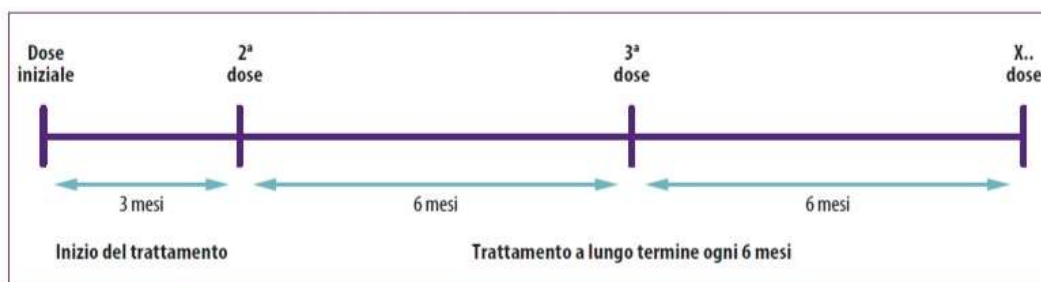


Figura 26. Regime posologico di Inclisiran

Il picco massimo della concentrazione plasmatica ( $C_{max}$ ) di farmaco viene raggiunto dopo circa 4 ore dall'iniezione e rimane stabile fino a 12 ore.

Studi di fase 1 hanno evidenziato che sia la  $C_{max}$  sia l'area sottesa alla curva (AUC) aumentano in maniera lineare in base alla dose somministrata: Inclisiran appare nel plasma dopo circa 30 minuti dall'inoculazione e mostra un'emivita di  $10,1 \pm 2,31$  ore, le concentrazioni plasmatiche poi diminuiscono rapidamente entro 24 ore a causa della distribuzione tissutale nel fegato e della clearance renale.

In ogni caso l'oligonucleotide non è più rilevabile nel plasma 24-48 ore dopo la somministrazione, indipendentemente dalla funzionalità renale del paziente.

È fondamentale sottolineare che il profilo della concentrazione plasmatica di Inclisiran non è correlato con la sua prolungata azione farmacodinamica: dopo la somministrazione sottocutanea, la clearance sistemica è stata stimata in  $5,6 \pm 1,3$  L/ora.<sup>16</sup>

La clearance renale rappresenta la principale via di eliminazione del farmaco, con circa un terzo della dose escreta nelle urine nelle 24 ore dopo la somministrazione. Per questa ragione è stata studiata la farmacocinetica di Inclisiran al variare della funzionalità renale del paziente.

È stato evidenziato che l' $AUC_0$ , così come la  $C_{max}$ , sembrano aumentare in caso di insufficienza renale fino ad un massimo di 4 volte nell'insufficienza grave, ciononostante il profilo farmacocinetico di Inclisiran non è correlato con la sua azione farmacologica: anche se il farmaco non è più rilevabile nel plasma dopo 48 ore dalla somministrazione, la riduzione di PCSK9 circolante e, di conseguenza anche quella dei livelli di LDL-c, perdurano per mesi.

Infatti, l'effetto del farmaco sui livelli di protein chinasi si è dimostrato del tutto sovrapponibile in pazienti con differente funzionalità renale (Figura 27).

Questa osservazione è di rilevante importanza clinica perché suggerisce che Inclisiran può essere assunto anche da pazienti con grave compromissione renale senza alcun aggiustamento nel dosaggio specifico.

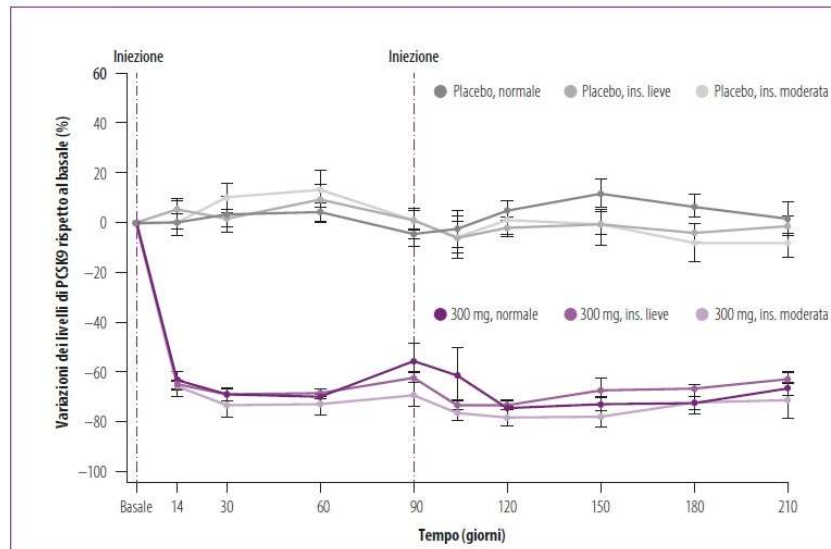


Figura 27. Effetti di Inclisiran sulla PCSK9 in relazione alla funzionalità renale

Per quanto riguarda i pazienti con insufficienza epatica non sono previsti aggiustamenti posologici in caso di compromissione epatica lieve (Child-Pugh classe A) o moderata (Child-Pugh classe B), tuttavia non sono al momento disponibili dati relativi a pazienti con compromissione epatica grave (Child-Pugh classe C), per i quali la somministrazione del farmaco deve essere fatta con cautela e dev'essere preceduta da un'attenta analisi.

Non vi sono altresì attualmente dati a disposizione circa l'uso di Inclisiran in pazienti di età inferiore ai 18 anni e in donne in gravidanza, per questo motivo, a scopo precauzionale, l'utilizzo del farmaco in queste categorie deve essere evitato. Non è infatti noto se il siRNA venga o meno escreto nel latte materno, perciò, un potenziale rischio per i neonati non può essere del tutto escluso. Nel caso fosse necessario iniziare il trattamento, il medico aiuterà la paziente a decidere se interrompere l'allattamento al seno a favore dell'assunzione del farmaco o viceversa.

Sulla base delle evidenze finora disponibili non si prevedono interazioni con l'attività dei citocromi P450, in quanto i filamenti guida e passenger di Inclisiran vengono degradati dalle esonucleasi.

Il farmaco, inoltre, non è substrato, né inibitore o induttore dei trasportatori, pertanto, non si prevede che vada incontro a interazioni farmacologiche con inibitori o induttori dei CYP450 e/o dei trasportatori e non ci sono al momento prove di influenze con atorvastatina, rosuvastatina o con altre statine.

#### Farmacodinamica di Inclisiran

Prendendo in considerazione il meccanismo d'azione di Inclisiran, la sua efficacia è misurabile in virtù della concentrazione di PCSK9 e di LDL-c plasmatici.

I primi studi di fase 1 hanno dimostrato che una singola somministrazione di 300 mg determina una riduzione dei livelli di PCSK9 del 75% rispetto al placebo, mentre per quanto riguarda i valori di LDL-c si osserva un effetto dose-risposta, con un iniziale

decremento del 25-30% dopo 5-10 giorni dalla somministrazione, fino a raggiungere una riduzione massimale del 50% a 15-30 giorni mantenendo poi uno stato stazionario.

L'effetto di Inclisiran sia su PCSK9 sia su LDL-c risulta molto significativo non soltanto in termini di efficacia ma anche, e soprattutto, per la lunga durata d'azione che perdura oltre 180 giorni dopo una singola somministrazione, migliorando la compliance del paziente.

Questa particolare proprietà è dovuta, in primo luogo, al fatto che la maggior parte della dose viene veicolata selettivamente negli epatociti, dove soltanto una piccola quota diventa biologicamente attiva e caricata sul RISC, il quale già di per sé ha una emivita di settimane. In secondo luogo, Inclisiran viene sequestrato negli endosomi, luogo nel quale viene immagazzinato creando una sorta di deposito dal quale può essere rilasciato lentamente nel tempo.

#### *Studi clinici di Inclisiran*

La sicurezza e l'efficacia dell'oligonucleotide sono state valutate nel programma di studi ORION, che è tuttora in corso.

Di seguito verranno presentati i risultati di tre studi di fase III di Inclisiran versus placebo:

1. ORION-9: Studio per valutare l'effetto del trattamento con Inclisiran sul colesterolo lipoproteico a bassa densità (LDL-c) in soggetti con ipercolesterolemia familiare eterozigote (HeFH).
2. ORION-10: Condotta negli Stati Uniti su pazienti affetti da patologie aterosclerotiche e cardiovascolari presentanti elevati livelli di LDL-c.
3. ORION-11: Studio condotto in Europa e Sud Africa in soggetti con ASCVD, o equivalenti di rischio (diabete di tipo 2, ipercolesterolemia familiare (FH)), e con elevati livelli di colesterolo lipoproteico a bassa densità.

Il regime terapeutico ha previsto una prima somministrazione di 300 mg, seguita da una seconda dose al giorno 90 e successivamente un'iniezione ogni 180 giorni.

Gli endpoint primari consistevano nella variazione percentuale di LDL-c, mentre, quelli secondari includevano: la variazione assoluta di LDL-c per il placebo dal basale al giorno 510, la variazione assoluta di LDL-c dal giorno 90 fino al giorno 540 e le variazioni percentuali dal giorno 1 al giorno 510 di PCSK9, colesterolo totale (TC), apolipoproteina B (Apo-B) e lipoproteine non ad alta densità (HDL)-c.<sup>17</sup>

In un primo momento sono stati trattati pazienti ad alto rischio cardiovascolare, con livelli di LDL-c >70 mg/dl, in presenza di pregressa malattia cardiovascolare aterosclerotica o >100 mg/dl in assenza di patologia. Sono stati divisi e randomizzati in 2 gruppi: il primo ha ricevuto una singola somministrazione di Inclisiran, mentre il secondo due somministrazioni a distanza di 90 giorni una dall'altra.

La doppia dose ha determinato un maggior effetto ipocolesterolemizzante con il 48% dei pazienti che ha ottenuto livelli di LDL-c al di sotto di 50 mg/dl, riducendo, di conseguenza, anche il potenziale rischio di incorrere in eventi cardiovascolari e raggiungendo gli obiettivi esposti nelle linee guida.

ORION-9 ha arruolato 482 pazienti adulti affetti da FH eterozigote, con livelli di LDL-c medi al basale di 153 mg/dL e già in terapia con farmaci ipolipemizzanti (statine ± ezetimibe).

L'iniezione sottocutanea di 300 mg di Inclisiran al giorno 510 ha determinato, rispetto all'inizio della terapia, una variazione assoluta di LDL-c del  $-47,9\%$  ed una riduzione dei livelli di PCSK9 circolanti pari al  $60,7\%$ .

In maniera del tutto sovrapponibile, nello studio ORION-10 e ORION-11 la molecola ha ridotto i livelli di lipoproteine a bassa densità rispettivamente del  $52,3\%$  e del  $42,9\%$ . A questo effetto ipocolesterolemizzante si è associata una riduzione superiore all' $80\%$  dei livelli circolanti di PCSK9.<sup>17</sup>

L'analisi cumulativa dei tre studi, ORION-9,-10,-11, ha compreso 3.660 partecipanti totali, di cui 482 provenienti da ORION-9, 1.561 da ORION-10 e 1.617 da ORION-11. La popolazione intention-to-treat ha incluso 1.833 partecipanti, mentre 1.827 soggetti hanno costituito il gruppo placebo.<sup>17</sup>

La metanalisi ha dimostrato una riduzione media di LDL-c nel gruppo ricevitore del farmaco rispetto al placebo del  $50,7\%$  e di PCSK9 plasmatico dell' $80,9\%$ ; la differenza assoluta in termini quantitativi al giorno 510, invece, è stata di  $55,1$  mg/dl (Figura 28).

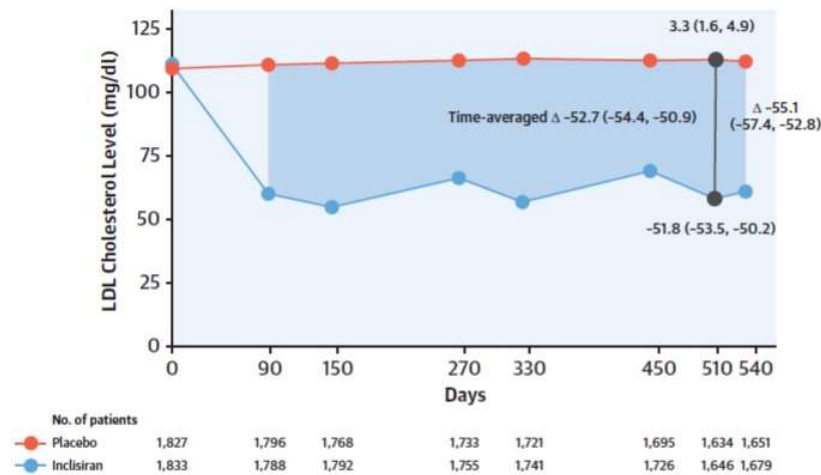


Figura 28. Variazione quantitativa di LDL-C tra gruppo trattato con Inclisiran e placebo

Inclisiran ha, inoltre, diminuito anche i livelli di colesterolo totale del  $32,4\%$ , del  $41,7\%$  l'Apo-B, la lipoproteina(a) e trigliceridi, mentre ha aumentato il colesterolo "buono" HDL.

In merito all'efficacia di Inclisiran è importante sottolineare che negli studi ORION-10 e -11, rispettivamente circa l' $89\%$  e il  $95\%$  dei pazienti reclutati era già in trattamento con statine, le quali, inibendo la biosintesi di colesterolo, determinano l'attivazione dei fattori di trascrizione SREBP che inducono sia l'espressione del recettore delle LDL sia PCSK9, da qui deriva il razionale nella combinazione con "inibitori" di PCSK9.

Come atteso, Inclisiran, così come gli anticorpi monoclonali anti PCSK9, ha dimostrato un'ottima efficacia ipocolesterolemica anche in pazienti in trattamento con statine.

#### Sicurezza di Inclisiran

Per quel che riguarda il profilo di sicurezza di Inclisiran, ad oggi, non si sono riscontrati particolari effetti avversi ad eccezione dell'aumento di reazioni cutanee, quali arrossamento, lividi o gonfiore nel sito di iniezione, verificatosi nel  $17\%$  circa dei casi, ma comunque di lieve entità e non persistenti. Nel  $2,6\%$  dei pazienti si sono sviluppati anticorpi antifarmaco, con un titolo relativamente basso, e bronchiti, che però non hanno avuto un

impatto rilevante nella salute del paziente. Da notare il fatto che TEAE (eventi avversi emergenti dal trattamento) sono stati segnalati anche dall'1,9% del gruppo placebo.<sup>17</sup>

L'azione epato-specifica di Inclisiran ha certamente contribuito all'assenza di effetti collaterali a livello muscolo-scheletrico, questo ha permesso di valutare l'efficacia e la tollerabilità del farmaco in individui intolleranti alle statine. In questa categoria di pazienti, il siRNA ha ridotto in modo importante e duraturo i livelli di LDL-c, presentando un quadro di eventi avversi paragonabile a quello del placebo.

Inclisiran rappresenta, quindi, una nuova e ottimale opzione terapeutica in pazienti ipercolesterolemici intolleranti alle statine.

I medici spesso si chiedono se un'ulteriore riduzione dei lipidi aiuterà i pazienti che sono già in trattamento con statine ad alto dosaggio, o altri ipolipemizzanti orali, a raggiungere gli obiettivi di LDL-c raccomandati dalle linee guida. I dati che si hanno fino ad oggi dimostrano che in circa il 68% dei pazienti l'aggiunta di Inclisiran porta ad un livello di LDL-c <70 mg/dl entro il giorno 510 partendo da un valore basale medio di 111,9 mg/dl e a valori inferiori a 50 mg/dl nel 52% dei pazienti.<sup>17</sup>

#### *Vantaggi di Inclisiran*

Uno dei principali vantaggi di Inclisiran rispetto ai mAbs riguarda la sua azione epato-specifica ed il legame esistente tra effetto ipocolesterolemizzante e induzione di nuovi casi di diabete di tipo 2 (T2D).

La selettività epatica deriva da due importanti considerazioni:

- 1) PCSK9 è di derivazione quasi esclusivamente epatica;<sup>18</sup>
- 2) evidenze sperimentali hanno evidenziato un ruolo della PCSK9 di origine extraepatica nella secrezione insulinica e nell'insorgenza di nuovi casi di diabete.<sup>19</sup>

È interessante notare che, sebbene le statine abbiano dimostrato di aumentare il rischio di T2D, una metanalisi di 35 studi randomizzati controllati condotti con gli inibitori di PCSK9 Evolocumab e Alirocumab, non ha condotto alla stessa conclusione.<sup>20</sup> Tuttavia, studi di randomizzazione mendeliana hanno chiaramente dimostrato che la riduzione di LDL-c, causata da varianti genetiche LOF di PCSK9, è associata ad un aumento di incidenza di diabete.

Sebbene il ruolo di Inclisiran nell'induzione di uno stato di insulino-resistenza sia ancora da chiarire, è importante sottolineare che questa molecola, tramite l'interazione fra GalNAc ed il suo recettore ASGPR, possiede un tropismo selettivo per il comparto epatico molto elevato e, quindi, un effetto limitato sul pancreas, tant'è che fino ad oggi non sono stati evidenziati casi di T2D nei pazienti trattati con il siRNA.

Inoltre, come discusso nei capitoli precedenti, la PCSK9 è rilevabile anche a livello vascolare, nel rene, nel cervello e nell'intestino, siti nei quali il suo ruolo fisiopatologico non è stato ancora del tutto chiarito. Da qui la possibilità che una sua inibizione farmacologica non epato-specifica possa determinare a lungo andare la comparsa di effetti collaterali e proprio per questo si è studiato un approccio più selettivo.

Un aspetto positivo da mettere in risalto è dato dal regime terapeutico del farmaco, infatti, grazie alla somministrazione biennale (ogni sei mesi) risulta essere molto favorevole per quel che riguarda l'aderenza terapeutica.

Nella pratica clinica, infatti, più del 70% dei pazienti con malattia aterosclerotica accertata non raggiunge il valore di LDL-c (55 mg/dL) raccomandato dalle linee guida. Dai vari

sondaggi eseguiti sui pazienti risulta che il fattore maggiormente implicato nel mancato raggiungimento degli obiettivi terapeutici è rappresentato dalla scarsa aderenza alle terapie attualmente disponibili, portando ad un aumentato rischio di CVD.

Il trattamento con statine richiede la loro assunzione giornaliera ed è accompagnata dall'insorgenza di mialgia in percentuale non irrilevante. Gli anticorpi monoclonali portano ad un'ottima riduzione dei livelli di LDL-c >50%, ma richiedono dalle 12 alle 16 somministrazioni annue, rappresentando un grosso onere per il paziente e creando una sfida all'aderenza terapeutica.

Il regime posologico di Inclisiran è in grado di soddisfare questa esigenza e, soprattutto, la popolazione studiata nel programma ORION rispecchia la tipologia dei pazienti gestita nella pratica clinica di routine. Inoltre, in 3.600 partecipanti agli studi ORION-9, -10 e -11, la percentuale di riduzione di LDL-c con Inclisiran rispetto al placebo variava dal 47,9% al 52,3%, con una riduzione media del 50,7% nell'analisi aggregata di tutti i dati, dimostrando una notevole e apprezzabile efficacia.

#### *Attualità*

Inclisiran è attualmente prodotto dall'azienda statunitense "Alnylam Pharmaceuticals" tramite The Medicines Company ed è commercializzato in Europa da Novartis con il nome **Leqvio** (figura 29).



*Figura 29. Leqvio: specialità di Inclisiran*

Il 15 ottobre 2020 il Comitato per i Prodotti Medicinali ad uso umano (CHMP), dell'Agenzia europea per i medicinali, ha fornito un giudizio positivo per l'uso del farmaco. A dicembre 2020 EMA ha approvato il farmaco e nell'agosto 2021 Inclisiran ha ricevuto l'approvazione dal National Institute for Health and Care Institute (NICE) per l'utilizzo nel Servizio Sanitario Nazionale della Gran Bretagna.

In Italia Leqvio deve ancora ricevere l'approvazione alla commercializzazione da parte dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), sono al momento in corso accordi per il prezzo di vendita.





## **5.CONCLUSIONI**

La riduzione di LDL-c osservata nei vari studi condotti e ancora in corso, suggerisce una possibile efficacia di Inclisiran nella prevenzione dell'aterosclerosi e nella riduzione di eventi cardiovascolari, nonostante ciò, il risultato sull'incidenza di eventi clinici si avrà nel 2026 a conclusione dello studio ORION-4. Quest'ultimo prevede la randomizzazione di oltre 15.000 pazienti di età  $\geq 55$  anni con ASCVD, trattati con Inclisiran 300 mg vs placebo per un follow-up di circa 5 anni.<sup>17</sup>

Studi clinici randomizzati, studi di registro e di randomizzazione mendeliana hanno comunque ampiamente dimostrato che la riduzione dei livelli di LDL-c si traduce sempre in una riduzione del rischio CVD. Le nuove linee guida ESC/EAS indicano, inoltre, soprattutto in pazienti a rischio alto/molto alto, la necessità di raggiungere livelli di LDL-c sempre più bassi, assolutamente in linea con il concetto di “the lower the better”.

Inclisiran, attraverso il suo tropismo selettivamente epatico, il regime posologico biennale e gli ottimi risultati terapeutici in termini di riduzione delle concentrazioni colesteroliche, è un promettente ed efficiente farmaco nella cura dell'ipercolesterolemia e nella prevenzione dell'aterosclerosi.



**APPENDICE**

PCSK9: Proproteina convertasi subtilisina/kexina tipo 9

LDL: Low Density Lipoprotein

LDL-c: Low Density Lipoprotein-cholesterol

LDLR: Recettore di LDL

VLDL: Very Low Density Lipoprotein

VLDLR: Recettore di VLDL

HDL: High Density Lipoprotein

mAbs: Anticorpi monoclonali

TH1: Linfociti T-helper 1

SKI-1/S1P: subtilisina/kexina-isoezima 1

GOF: Gain Of Function

LOF: Loss Of Function

SREBP: Sterol regulatory element-binding proteins

KO: Knockout

CVD: Cardiovascular disease

CHD: Coronary Heart Disease

HbA1C: Emoglobina glicata

PC: Protein chinasi

ENaC: Canale epiteliale Na<sup>+</sup>

Lp(a): Lipoproteina altamente aterogenica

CLP: Pratica clinica che mima la sepsi

HCV: Virus dell'epatite C

SNP: Polimorfismi a singolo nucleotide

FFA: Free Fatty Acids

TG: Trigliceridi

CKD: Chronic Kidney Disease

CGN: Colture neuronali dei granuli cerebellari

AD: Alzheimer

A $\beta$ :  $\beta$ -amiloide

BACE1: Proteina precursore della  $\beta$ -amiloide

BEE: Barriera Emato Encefalica  
ER: Reticolo Endoplasmico  
CML: Cellule muscolari lisce  
RZR: Red Yeast Rice  
RCT: Studi clinici randomizzati  
CYP450: Citocromo P450  
EFSA: European Food Safety Agency  
AIFA: Agenzia Italiana del Farmaco  
HMG-CoA: 3-idrossi-3-metil-glutaril-coenzima A  
CPK: Creatinchinasi  
OR: Odds Ratio  
PCR: Proteina C Reattiva  
RZR1: Recettore 1 della rianodina  
NPC1L1: Niemann-Pick C1-like 1  
FH: Ipercolesterolemia Familiare  
HoFH: Ipercolesterolemia Familiare Omozigote  
HeFH: Ipercolesterolemia Familiare Eterozigote  
ASO: AntiSense Oligonucleotides  
siRNA: Short Interfering RNA  
mRNA: RNA messaggero  
SCORE: Systematic Coronary Risk Estimation  
TC: Total Cholesterol  
RISC: RNA-induced silencing complex)  
Ago2: Argonaute 2  
GalNAc: N-acetilgalattosamina  
ASGPR: Recettore dell'asialoglicoproteina  
ANGPTL3: Angiopietin-like 3  
TEAE: Treatment emergent adverse events  
T2D: Diabete di tipo 2

**BIBLIOGRAFIA DELLE IMMAGINI**

1. <http://www.bio.unipd.it/fdl/ChimClin/4.%20Lipidi.pdf>
2. Zárate A, Manuel-Apolinar L, Basurto L, De la Chesnaye E, Saldívar I. Colesterol y aterosclerosis. Consideraciones históricas y tratamiento [Cholesterol and atherosclerosis. Historical considerations and treatment]. *Arch Cardiol Mex.* 2016 Apr-Jun;86(2):163-9. Spanish. doi: 10.1016/j.acmx.2015.12.002. Epub 2016 Jan 7. PMID: 26774359.
3. <https://www.unica.it/static/resources/cms/documents/lipoproteine2020.pdf>
4. Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature.* 2021 Apr;592(7855):524-533. doi: 10.1038/s41586-021-03392-8. Epub 2021 Apr 21. PMID: 33883728
5. BSIP – Science Photo Library
6. Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature.* 2021 Apr;592(7855):524-533. doi: 10.1038/s41586-021-03392-8. Epub 2021 Apr 21. PMID: 33883728
7. © 2017 ELLIOT K. FISHMAN, MD
8. Seidah NG, Abifadel M, Prost S, Boileau C, Prat A. The Proprotein Convertases in Hypercholesterolemia and Cardiovascular Diseases: Emphasis on Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9. *Pharmacol Rev.* 2017 Jan;69(1):33-52. doi: 10.1124/pr.116.012989. PMID: 27920219.
9. Seidah NG, Abifadel M, Prost S, Boileau C, Prat A. The Proprotein Convertases in Hypercholesterolemia and Cardiovascular Diseases: Emphasis on Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9. *Pharmacol Rev.* 2017 Jan;69(1):33-52. doi: 10.1124/pr.116.012989. PMID: 27920219
10. Ogura M. PCSK9 inhibition in the management of familial hypercholesterolemia. *J Cardiol.* 2018 Jan;71(1):1-7. doi: 10.1016/j.jjcc.2017.07.002. Epub 2017 Aug 5. PMID: 28784313
11. Ogura M. PCSK9 inhibition in the management of familial hypercholesterolemia. *J Cardiol.* 2018 Jan;71(1):1-7. doi: 10.1016/j.jjcc.2017.07.002. Epub 2017 Aug 5. PMID: 28784313
12. Seidah NG, Awan Z, Chrétien M, Mbikay M. PCSK9: a key modulator of cardiovascular health. *Circ Res.* 2014 Mar 14;114(6):1022-36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.301621. PMID: 24625727.
13. Ogura M. PCSK9 inhibition in the management of familial hypercholesterolemia. *J Cardiol.* 2018 Jan;71(1):1-7. doi: 10.1016/j.jjcc.2017.07.002. Epub 2017 Aug 5. PMID: 28784313
14. Norata GD, Tavori H, Pirillo A, Fazio S, Catapano AL. Biology of proprotein convertase subtilisin kexin 9: beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering. *Cardiovasc Res.* 2016 Oct;112(1):429-42. doi: 10.1093/cvr/cvw194. Epub 2016 Aug 5. PMID: 27496869; PMCID: PMC5031950
15. Dal review “PCSK9: from the functional characterization to the therapeutic inhibition” di Gianpaolo Tibolla, Giuseppe Danilo Norata, Alberico Luigi Catapano.
16. Norata GD, Tavori H, Pirillo A, Fazio S, Catapano AL. Biology of proprotein convertase subtilisin kexin 9: beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering. *Cardiovasc Res.* 2016 Oct;112(1):429-42. doi: 10.1093/cvr/cvw194. Epub 2016 Aug 5. PMID: 27496869; PMCID: PMC5031950
17. <https://healthy.thewom.it/integratori/riso-rosso-fermentato>

18. Chen CH, Yang JC, Uang YS, Lin CJ. Improved dissolution rate and oral bioavailability of lovastatin in red yeast rice products. *Int J Pharm.* 2013 Feb 28;444(1-2):18-24. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.01.028. Epub 2013 Jan 23. PMID: 23352857
19. Cicero AFG, Fogacci F, Zambon A. Red Yeast Rice for Hypercholesterolemia: JACC Focus Seminar. *J Am Coll Cardiol.* 2021 Feb 9;77(5):620-628. doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.056. PMID: 33538260.
20. Cicero AFG, Fogacci F, Zambon A. Red Yeast Rice for Hypercholesterolemia: JACC Focus Seminar. *J Am Coll Cardiol.* 2021 Feb 9;77(5):620-628. doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.056. PMID: 33538260
21. [www.uniroma2.it/didattica/immunotb](http://www.uniroma2.it/didattica/immunotb)
22. GG, Delgado V, Ference BA, Graham IM, Halliday A, Landmesser U, Mihaylova B, Pedersen TR, Riccardi G, Richter DJ, Sabatine MS, Taskinen MR, Tokgozoglul L, Wiklund O; ESC Scientific Document Group. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J.* 2020 Jan 1;41(1):111-188. doi: 10.1093/eurheartj/ehz455. Erratum in: *Eur Heart J.* 2020 Nov 21;41(44):4255. PMID: 31504418
23. InFocus. Dislipidemie: nuovi approcci terapeutici. Terapia genica per il trattamento dell'ipercolesterolemia. Nicola Ferri. Alberto Corsini
24. InFocus. Dislipidemie: nuovi approcci terapeutici..Farmacologia clinica di Incliran. Nicola Ferri. Alberto Corsini.  
Khvorova A. Oligonucleotide Therapeutics - A New Class of Cholesterol-Lowering Drugs. *N Engl J Med.* 2017; 376:4-7.
25. InFocus. Dislipidemie: nuovi approcci terapeutici..Farmacologia clinica di Incliran. Nicola Ferri. Alberto Corsini.  
Khvorova A. Oligonucleotide Therapeutics - A New Class of Cholesterol-Lowering Drugs. *N Engl J Med.* 2017; 376:4-7.
26. InFocus. Dislipidemie: nuovi approcci terapeutici..Farmacologia clinica di Incliran. Nicola Ferri. Alberto Corsini
27. InFocus. Dislipidemie: nuovi approcci terapeutici..Farmacologia clinica di Incliran. Nicola Ferri. Alberto Corsini.  
Wright RS, Collins MG, Stoekenbroek RM, Robson R, Wijngaard PLJ, Landmesser U, et al. Effects of Renal Impairment on the Pharmacokinetics, Efficacy, and Safety of Inclisiran: An Analysis of the ORION-7 and ORION-1 Studies. *Mayo Clin Proc* 2020;95(1):77-89.
28. Wright RS, Ray KK, Raal FJ, Kallend DG, Jaros M, Koenig W, Leiter LA, Landmesser U, Schwartz GG, Friedman A, Wijngaard PLJ, Garcia Conde L, Kastelein JJP; ORION Phase III Investigators. Pooled Patient-Level Analysis of Inclisiran Trials in Patients With Familial Hypercholesterolemia or Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2021 Mar 9;77(9):1182-1193. doi: 10.1016/j.jacc.2020.12.058. PMID: 33663735.
29. <https://www.clinicaltrialsarena.com/projects/leqvio-inclisiran-hypercholesterolaemia/>

**BIBLIOGRAFIA**

1. Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature*. 2021 Apr;592(7855):524-533. doi: 10.1038/s41586-021-03392-8. Epub 2021 Apr 21. PMID: 33883728.
2. <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/disturbi-dellapparato-cardiovascolare/arteriosclerosi>
3. Seidah NG, Abifadel M, Prost S, Boileau C, Prat A. The Proprotein Convertases in Hypercholesterolemia and Cardiovascular Diseases: Emphasis on Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9. *Pharmacol Rev*. 2017 Jan;69(1):33-52. doi: 10.1124/pr.116.012989. PMID: 27920219.
4. Seidah NG, Awan Z, Chrétien M, Mbikay M. PCSK9: a key modulator of cardiovascular health. *Circ Res*. 2014 Mar 14;114(6):1022-36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.301621. PMID: 24625727.
5. Ogura M. PCSK9 inhibition in the management of familial hypercholesterolemia. *J Cardiol*. 2018 Jan;71(1):1-7. doi: 10.1016/j.jjcc.2017.07.002. Epub 2017 Aug 5. PMID: 28784313.
6. Nicholls SJ, Puri R, Anderson T, Ballantyne CM, Cho L, Kastelein JJ, Koenig W, Somaratne R, Kassahun H, Yang J, Wasserman SM, Scott R, Ungi I, Podolec J, Ophuis AO, Cornel JH, Borgman M, Brennan DM, Nissen SE. Effect of Evolocumab on Progression of Coronary Disease in Statin-Treated Patients: The GLAGOV Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2016 Dec 13;316(22):2373-2384. doi: 10.1001/jama.2016.16951. PMID: 27846344.
7. Norata GD, Tavori H, Pirillo A, Fazio S, Catapano AL. Biology of proprotein convertase subtilisin kexin 9: beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering. *Cardiovasc Res*. 2016 Oct;112(1):429-42. doi: 10.1093/cvr/cvw194. Epub 2016 Aug 5. PMID: 27496869; PMCID: PMC5031950.
8. Lipinski MJ, Benedetto U, Escarcega RO, Biondi-Zoccai G, Lhermusier T, Baker NC, Torguson R, Brewer HB Jr, Waksman R. The impact of proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 serine protease inhibitors on lipid levels and outcomes in patients with primary hypercholesterolaemia: a network meta-analysis. *Eur Heart J* 2016;37:536–545.
9. Kong W, Wei J, Abidi P, Lin M, Inaba S, Li C, Wang Y, Wang Z, Si S, Pan H, Wang S, Wu J, Wang Y, Li Z, Liu J, Jiang JD. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. *Nat Med*. 2004 Dec;10(12):1344-51. doi: 10.1038/nm1135. Epub 2004 Nov 7. PMID: 15531889.
10. Chen CH, Yang JC, Uang YS, Lin CJ. Improved dissolution rate and oral bioavailability of lovastatin in red yeast rice products. *Int J Pharm*. 2013 Feb 28;444(1-2):18-24. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.01.028. Epub 2013 Jan 23. PMID: 23352857.
11. Cicero AFG, Fogacci F, Zambon A. Red Yeast Rice for Hypercholesterolemia: JACC Focus Seminar. *J Am Coll Cardiol*. 2021 Feb 9;77(5):620-628. doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.056. PMID: 33538260.
12. <https://www.doctorium.it>
13. Angoulvant D, Pathak A. Place des anticorps thérapeutiques dans les maladies cardiovasculaires et métaboliques aujourd’hui [Monoclonal antibodies in

- cardiovascular diseases and metabolic disorders today]. *Med Sci (Paris)*. 2019 Dec;35(12):1014-1016. French. doi: 10.1051/medsci/2019224. Epub 2020 Jan 6. PMID: 31903910.
14. Seidah NG, Awan Z, Chrétien M, Mbikay M. PCSK9: a key modulator of cardiovascular health. *Circ Res*. 2014 Mar 14;114(6):1022-36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.301621. PMID: 24625727.
  15. Graham MJ, Lee RG, Brandt TA, Tai LJ, Fu W, Peralta R, et al. Cardiovascular and Metabolic Effects of ANGPTL3 Antisense Oligonucleotides. *N Engl J Med* 2017;377(3): 222-232.
  16. Wright RS, Collins MG, Stoekenbroek RM, Robson R, Wijngaard PLJ, Landmesser U, et al. Effects of Renal Impairment on the Pharmacokinetics, Efficacy, and Safety of Inclisiran: An Analysis of the ORION-7 and ORION-1 Studies. *Mayo Clin Proc* 2020;95(1):77-89.
  17. Wright RS, Ray KK, Raal FJ, Kallend DG, Jaros M, Koenig W, Leiter LA, Landmesser U, Schwartz GG, Friedman A, Wijngaard PLJ, Garcia Conde L, Kastelein JJP; ORION Phase III Investigators. Pooled Patient-Level Analysis of Inclisiran Trials in Patients With Familial Hypercholesterolemia or Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2021 Mar 9;77(9):1182-1193. doi: 10.1016/j.jacc.2020.12.058. PMID: 33663735.
  18. Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Hamelin J, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology* 2008;48(2):646-654.
  19. Schmidt AF, Swerdlow DI, Holmes MV, Patel RS, Fairhurst-Hunter Z, Lyall DM, et al. PCSK9 genetic variants and risk of type 2 diabetes: a mendelian randomisation study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2017;5(2):97-105.
  20. Karatasakis A, Danek BA, Karacsonyi J, Rangan BV, Roesle MK, Knickelbine T, et al. Effect of PCSK9 Inhibitors on Clinical Outcomes in Patients With Hypercholesterolemia: A Meta-Analysis of 35 Randomized Controlled Trials. *J Am Heart Assoc* 2017;6(12):e006910.