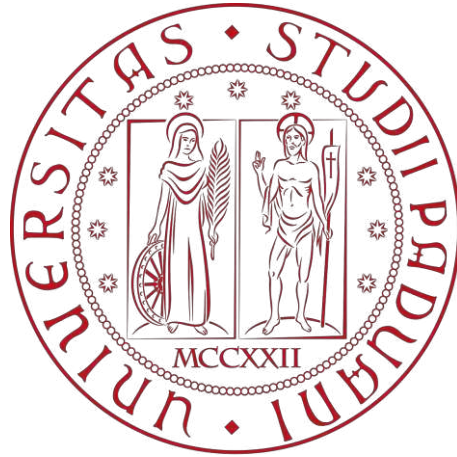


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO SCIENZE DEL FARMACO



LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

Tesi di laurea

Valutazione della cinetica d'azione di  
Inclisiran e della sua attività farmacologica  
in presenza di Simvastatina in cellule HepG2

Relatore: Chiar.ma Prof.ssa Sara De Martin

Correlatore: Dott.ssa Maria Giovanna Lupo

Laureando: Andrea Beghetto

Anno Accademico 2024/2025



## ***Sommario***

Le malattie cardiovascolari (MCV) rappresentano la principale causa di morte a livello mondiale, con circa 17,9 milioni di decessi all'anno, pari al 32% di tutte le morti globali secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità. In Italia, i dati ISTAT indicano che il 38% dei decessi annuali è imputabile a patologie cardiovascolari. Tra i fattori di rischio, l'ipercolesterolemia svolge un ruolo centrale, contribuendo in modo significativo allo sviluppo dell'aterosclerosi e degli eventi cardiovascolari maggiori, come infarto miocardico e ictus.

Il colesterolo LDL (*low-density lipoprotein*) è il parametro lipidico più fortemente associato al rischio cardiovascolare. Secondo lo SCORE2 dell'ESC (*European Society of Cardiology*), per ogni riduzione di 1 mmol/L del colesterolo LDL si ottiene una riduzione del rischio cardiovascolare maggiore del 20%. Le Statine costituiscono il trattamento di prima linea per la gestione dell'ipercolesterolemia, ma fino al 20% dei pazienti non raggiunge i target terapeutici raccomandati o manifesta intolleranza agli effetti collaterali.

In questo contesto, un'opzione innovativa è rappresentata da Inclisiran, un siRNA (*small interfering RNA*) che riduce la sintesi epatica della proteina PCSK9, favorendo l'aumento dei recettori LDL. I trial ORION-9, -10 e -11 hanno dimostrato una riduzione media del colesterolo LDL di circa il 50%, con una somministrazione iniziale, seguita da un richiamo a 90 giorni che prosegue tramite iniezioni sottocutanee successive ogni sei mesi. In combinazione con le Statine, l'efficacia si potenzia, raggiungendo riduzioni fino al 60% del colesterolo LDL, con un'aderenza terapeutica che si aggira al 95%.

La presente tesi si apre con un inquadramento generale su metabolismo del colesterolo e dislipidemie, fisiopatologia dell'aterosclerosi e della sindrome coronarica acuta, funzione di LDLR e PCSK9 e strategie ipolipidizzanti. Successivamente vengono descritti i saggi sperimentali condotti.

Gli studi sono stati condotti *in vitro*, su cellule HepG2 di epatocarcinoma umano. Nelle prime fasi, è stato verificato che, alle concentrazioni designate, il trattamento non altera la vitalità cellulare: i test di citotossicità non hanno mostrato differenze significative rispetto ai controlli, consentendo di proseguire con gli studi di attività molecolare. L'analisi

mediante RT-qPCR ha evidenziato una riduzione trascrizionale di PCSK9, mentre il Western blot ha confermato una diminuzione del livello proteico, accompagnata da un aumento di LDLR. L'andamento dose-dipendente osservato per entrambi i marcatori supporta il legame tra silenziamento di PCSK9 e miglioramento della capacità di rimozione delle LDL.

Definita la finestra attiva e non citotossica, è stata scelta 5  $\mu$ M come concentrazione di riferimento per i time-course. I dati hanno indicato un'insorgenza precoce della modulazione dell'asse PCSK9-LDLR già dalle prime ore e un mantenimento dell'effetto nelle finestre temporali successive.

In ultima analisi, la combinazione con Simvastatina ha confermato *in vitro* quanto riportato in clinica dallo studio INCLIVEN dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona, in cui la somministrazione congiunta dei due trattamenti determinava una riduzione aggiuntiva del 15,7% del colesterolo LDL rispetto al solo Inclisiran. La Statina, in monosomministrazione, ha indotto un aumento di PCSK9, oltre che di LDLR, mentre l'aggiunta di Inclisiran ha attenuato questo effetto, consolidando anche l'incremento del recettore. I risultati confermano l'efficacia cellulare della cosomministrazione ed il razionale alla base del suo impiego.



# Indice

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 COLESTEROLO</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Sintesi del colesterolo .....	1
1.1.2 Lipoproteine .....	4
<b>1.2 DISLIPIDEMIE</b> .....	<b>8</b>
1.2.1 Metodi di misura del colesterolo .....	11
<b>1.3 ATEROSCLEROSI</b> .....	<b>14</b>
1.3.1 Meccanismo molecolare .....	16
1.3.2 Placca aterosclerotica.....	17
1.3.3 Conseguenze dell'aterosclerosi .....	18
1.3.4 Biomarcatori.....	20
<b>1.4 SINDROME CORONARICA ACUTA</b> .....	<b>22</b>
1.4.1 Rottura della placca .....	23
1.4.2 Erosione della placca .....	25
1.4.3 Cause non aterosclerotiche .....	26
<b>1.5 RECETTORE PER LE LIPOPROTEINE A BASSA DENSITÀ</b> .....	<b>29</b>
1.5.1 Struttura recettoriale .....	31
1.5.2 Internalizzazione e riciclo del recettore LDL.....	32
1.5.3 Regolazione recettoriale .....	33
<b>1.6 PROTEINA CONVERTASI SUBTILISINA/KEXINA DI TIPO 9</b> .....	<b>35</b>
1.6.1 Struttura e funzioni .....	37
1.6.2 Pathway molecolare .....	38
1.6.3 Regolazione genica di PCSK9 .....	39
<b>1.7 TERAPIE IPOLIPIDEMIZZANTI</b> .....	<b>42</b>
1.7.1 Statine .....	42
1.7.1.1 Struttura chimica e classificazione .....	43
1.7.1.2 Meccanismo d'azione .....	47
1.7.1.3 Aspetti farmacologici.....	48
1.7.1.4 Efficacia dose-dipendente.....	51
1.7.1.5 Reazioni avverse .....	51
1.7.2 Inclisiran - LEQVIO® .....	58
1.7.2.1 Sintesi industriale e struttura chimica .....	59
1.7.2.2 Meccanismo d'azione.....	61
1.7.2.3 Farmacocinetica .....	62
1.7.2.4 Studi clinici .....	65
<b>2. SCOPO</b> .....	<b>76</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>78</b>
3.1 SEMINA CELLULARE.....	80
3.2 VITALITÀ CELLULARE .....	82
3.3 ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOTTING .....	84
3.4 ANALISI QUANTITATIVA MEDIANTE PCR .....	95
3.5 QUANTIFICAZIONE DELLE PROTEINE SECRETE TRAMITE SAGGIO ELISA .....	101
3.6 TIME-COURSE CON INCLISIRAN 5 $\mu$ M .....	104
3.7 COMBINAZIONE INCLISIRAN + SIMVASTATINA .....	105
<b>4. RISULTATI</b> .....	<b>107</b>
4.1 INCLISIRAN NON ALTERA LA VITALITÀ CELLULARE IN CELLULE HEPG2.....	107

<i>4.2 INCLISIRAN RIDUCE I LIVELLI PROTEICI E TRASCRIZIONALI DI PCSK9 ED INCREMENTA QUELLI DI LDLR</i> .....	<b>108</b>
<i>4.3 INCLISIRAN NON RIDUCE IN MANIERA SIGNIFICATIVA I LIVELLI DI SECREZIONE DI PCSK9</i> .....	<b>111</b>
<i>4.4 INCLISIRAN RISULTA ESSERE EFFICACE ANCHE A TEMPISTICHE MOLTO BREVI</i> .....	<b>112</b>
<i>4.5 INCLISIRAN NON MODULA LA SECREZIONE DI PCSK9 A TEMPI BREVI</i> .....	<b>114</b>
<i>4.6 INCLISIRAN CONTRASTA L'INDUZIONE DI PCSK9 INDOTTA DA SIMVASTATINA</i> .....	<b>115</b>
<i>4.7 L'AUMENTATA SECREZIONE DI PCSK9 INDOTTA DA SIMVASTATINA VIENE MODULATA EFFICACEMENTE DA INCLISIRAN</i> .....	<b>118</b>
<b>5. DISCUSSIONE</b> .....	<b>120</b>
<b>6. CONCLUSIONE</b> .....	<b>125</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>127</b>

## ***Lista delle abbreviazioni***

<b><i>OMS</i></b>	Organizzazione Mondiale della Sanità
<b><i>MCV</i></b>	Malattie cardiovascolari
<b><i>ESC</i></b>	Società europea di cardiologia
<b><i>AA</i></b>	Amminoacidi
<b><i>VLDL</i></b>	Lipoproteine a densità molto bassa
<b><i>LPL</i></b>	Lipoprotein-lipasi
<b><i>CE</i></b>	Esteri del colesterolo
<b><i>TAG</i></b>	Triacilgliceroli
<b><i>CM</i></b>	Chilomicroni
<b><i>IDL</i></b>	Lipoproteina a densità intermedi
<b><i>LDL</i></b>	Lipoproteine a bassa densità
<b><i>LDLR</i></b>	Recettore per le LDL
<b><i>HDL</i></b>	Lipoproteine ad alta densità
<b><i>LCAT</i></b>	Lecitina-colesterolo aciltransferasi
<b><i>SR-BI</i></b>	Scavenger receptor class B type I
<b><i>FH</i></b>	Ipercolesterolemia familiare
<b><i>HeFH</i></b>	Ipercolesterolemia familiare eterozigote
<b><i>MMP</i></b>	Metalloproteinasi della matrice
<b><i>ACS</i></b>	Sindrome coronarica acuta
<b><i>cTn</i></b>	Troponina cardiaca
<b><i>EC</i></b>	Cellule endoteliali
<b><i>PC</i></b>	Proteinchinasi
<b><i>AOTP</i></b>	Polipeptidi trasportatori di anioni organici
<b><i>HOCl</i></b>	Acido ipocloroso
<b><i>MPO</i></b>	Mieloperossidasi
<b><i>TRL2</i></b>	Recettore Toll-like 2
<b><i>NETs</i></b>	Neutrophil extracellular traps
<b><i>OCT</i></b>	Tomografia a coerenza ottica
<b><i>SCAD</i></b>	Dissezione coronarica spontanea
<b><i>HMG-CoAR</i></b>	3-idrossi-3-metilglutaril-CoA reduttasi
<b><i>LILRB5</i></b>	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B
<b><i>LDH</i></b>	Lattato deidrogenasi
<b><i>FOXP3</i></b>	Forkhead box P3
<b><i>SAMS</i></b>	Sintomi muscolari associati alle Statine
<b><i>RAP</i></b>	Receptor-associated protein
<b><i>K<sub>i</sub></i></b>	Costante di inibizione
<b><i>ROS</i></b>	Specie reattive dell'ossigeno
<b><i>MPT</i></b>	Transizione di permeabilità mitocondriale
<b><i>MCU</i></b>	Uniport mitocondriale del calcio
<b><i>VDAC</i></b>	Canali anionici voltaggio-dipendenti
<b><i>PTP</i></b>	Poro di transizione della permeabilità mitocondriale
<b><i>F<sub>c</sub></i></b>	Frazione costante
<b><i>ELISA</i></b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b><i>DILI</i></b>	Epatite autoimmune indotta da farmaco
<b><i>RR</i></b>	Rischio relativo
<b><i>SCAP</i></b>	SREBP Cleavage-Activating Protein
<b><i>CPT2</i></b>	Carnitina palmitoiltransferasi 2
<b><i>PRR</i></b>	Pattern recognition receptor
<b><i>INF-<math>\gamma</math></i></b>	Interferone gamma
<b><i>VSMC</i></b>	Cellule muscolari lisce vascolari

<b>PAR</b>	Poly(ADP-ribose)
<b>PARP</b>	Poly(ADP-ribose)polymerase
<b>tPA</b>	L'attivatore tissutale del plasminogeno
<b>TC</b>	Tomografia computerizzata
<b>CAC</b>	Calcium score coronarico
<b>CCTA</b>	Angiografia coronarica tomografica
<b>apoA1</b>	Apolipoproteina A1
<b>apoB</b>	Apolipoproteina B
<b>apoC</b>	Apolipoproteina C
<b>apoE</b>	Apolipoproteina E
<b>MPO</b>	Mieloperossidasi
<b>hs-PCR</b>	Proteina C reattiva ad alta sensibilità
<b>IL-6</b>	Interleuchina-6
<b>PTX-3</b>	Pentraxina 3
<b>NT-proBNP</b>	Propeptide natriuretico di tipo B
<b>AB</b>	Anticorpi monoclonali
<b>SiRNA</b>	Small interfering RNA
<b>MPO</b>	Mieloperossidasi
<b>PCSK</b>	Proproteine convertasi di tipo subtilisina/kexina
<b>SP</b>	Peptide segnale
<b>EGF-A</b>	Fattore di crescita epidermico-A
<b>SRE</b>	Elemento regolatore dello sterolo
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Recettore degli estrogeni $\alpha$
<b>PLC-<math>\gamma</math></b>	Fosfolipasi $\gamma$
<b>GPRE</b>	Recettore degli estrogeni della proteina G
<b>DMT</b>	Dimetossitriifenilmetil
<b>GalNac</b>	N-acetilgalattosammina
<b>ASGPR</b>	Asialoglicoproteina
<b>RISC</b>	Complesso silenziatore indotto dall'RNA
<b>PAZ</b>	Piwi/Argonaute/Zwille
<b>LLT</b>	Terapie ipolipemizzanti
<b>LSM</b>	Riduzione media dei minimi quadrati
<b>ASCVD RE</b>	Malattia cardiovascolare aterosclerotica con rischio equivalente
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>FBS</b>	Siero fetale bovino
<b>NEAA</b>	Ammioacidi non essenziali
<b>FBS</b>	Tampone fosfato salino
<b>SRB</b>	Sulforodamina B
<b>TCA</b>	Acido tricloroacetico
<b>BCA</b>	Bicinchoninic Acid Assay
<b>BSA</b>	Albumina sierica bovina
<b>PAGE</b>	Elettroforesi su gel di poliacrilammide
<b>SDS</b>	Sodio dodecil solfato
<b>HRP</b>	perossidasi di rafano

### ***Lista delle figure***

- Figura 1.*            Struttura chimica del colesterolo. *Pag 1*
- Figura 2.*            Processo biochimico della formazione del colesterolo. *Pag 3*
- Figura 3.*            Rappresentazione di una lipoproteina. *Pag 4*

<i>Figura 4.</i>	Classificazione delle principali lipoproteine. <i>Pag 5</i>
<i>Figura 5.</i>	Lipoproteine e trasporto lipidico. <i>Pag 7</i>
<i>Figura 6.</i>	Mutazioni del recettore per le LDL. <i>Pag 10</i>
<i>Figura 7.</i>	Sezione di aorta con strie lipidiche. <i>Pag 14</i>
<i>Figura 8.</i>	Evoluzione di una placca aterosclerotica. <i>Pag 15</i>
<i>Figura 9.</i>	Rottura della placca e trombosi coronarica acuta. <i>Pag 16</i>
<i>Figura 10.</i>	Arteria coronarica stenotica. <i>Pag 18</i>
<i>Figura 11.</i>	Distinzione e classificazione della sindrome coronarica acuta. <i>Pag 23</i>
<i>Figura 12.</i>	Regolazione di LDLR mediata da SREBP. <i>Pag 31</i>
<i>Figura 13.</i>	Architettura funzionale di LDLR. <i>Pag 32</i>
<i>Figura 14.</i>	Ciclo del recettore per le LDL e regolazione intracellulare del colesterolo. <i>Pag 34</i>
<i>Figura 15.</i>	Struttura cristallina di PCSK9. <i>Pag 36</i>
<i>Figura 16.</i>	Schema strutturale delle protein convertasi. <i>Pag 37</i>
<i>Figura 17.</i>	Maturazione di PCSK9. <i>Pag 38</i>
<i>Figura 18.</i>	Pathway di LDLR e degradazione ad opera di PCSK9. <i>Pag 40</i>
<i>Figura 19.</i>	Regolazione estrogenica di PCSK9. <i>Pag 41</i>
<i>Figura 20.</i>	Struttura chimica e classificazione delle Statine presenti in commercio. <i>Pag 45</i>
<i>Figura 21.</i>	Modalità di binding delle Statine con HMG-CoAR. <i>Pag 48</i>
<i>Figura 22.</i>	Riduzione percentuale del LDL-C tramite Statine, in funzione della dose. <i>Pag 51</i>
<i>Figura 23.</i>	Stress ossidativo mitocondriale indotto dalle Statine. <i>Pag 55</i>
<i>Figura 24.</i>	Possibile meccanismo molecolare alla base della rhabdomiolisi indotta da Statine. <i>Pag 57</i>
<i>Figura 25.</i>	Forma farmaceutica di Inclisiran. <i>Pag 59</i>
<i>Figura 26.</i>	Produzione industriale di Inclisiran. <i>Pag 60</i>
<i>Figura 27.</i>	Struttura chimica di Inclisiran. <i>Pag 61</i>
<i>Figura 28.</i>	Meccanismo d'azione di Inclisiran. <i>Pag 62</i>
<i>Figura 29.</i>	Profilo medio ( $\pm$ DS) della concentrazione di Inclisiran in funzione del tempo dopo SAD. <i>Pag 64</i>
<i>Figura 30.</i>	Profilo medio ( $\pm$ DS) della concentrazione di Inclisiran in funzione del tempo dopo MD. <i>Pag 67</i>
<i>Figura 31.</i>	Concentrazione di Inclisiran e AS(n-1) in ORION-7. <i>Pag 66</i>
<i>Figura 32.</i>	Effetto di Inclisiran sui livelli di PCSK9 e LDL-C. <i>Pag 68</i>
<i>Figura 33.</i>	Variazioni percentuali di LDL-C dal basale di ORION-1 al giorno 1440 di ORION-3 e dal basale di ORION-3 al giorno 1440 di ORION-3. <i>Pag 69</i>
<i>Figura 34.</i>	Variazioni percentuali ed assolute di PCSK9 e LDL-C in 540 giorni. <i>Pag 71</i>
<i>Figura 35.</i>	Efficacia di Inclisiran e placebo nella riduzione di LDL-C in 540 giorni. <i>Pag 73</i>
<i>Figura 36.</i>	Efficacia di Inclisiran e placebo nella riduzione di PCSK9 in 540 giorni. <i>Pag 72</i>
<i>Figura 37.</i>	Lista dei trial clinici ORION in funzione di Inclisiran. <i>Pag 74</i>
<i>Figura 38.</i>	Struttura chimica Solforodamina B. <i>Pag 82</i>

- Figura 39.* Formazione del complesso BCA-ione rameoso. *Pag 86*
- Figura 40.* Schema elettroforesi SDS-PAGE. *Pag 89*
- Figura 41.* Trans-blot di trasferimento. *Pag 91*
- Figura 42.* Reazione chemiluminescenza del luminolo mediata da HRP. *Pag 93*
- Figura 43.* Rappresentazione del rilievo di proteine tramite ECL. *Pag 93*
- Figura 44.* Amplificazione in qPCR. *Pag 96*
- Figura 45.* Schema riassuntivo delle fasi di esecuzione della RT-qPCR. *Pag 97*
- Figura 46.* Schema illustrativo del principio del saggio ELISA. *Pag 103*
- Figura 47.* Vitalità cellulare di HepG2 in seguito a trattamento con Inclisiran a 48 ore. *Pag 107*
- Figura 48.* Espressione proteica di LDLR e PCSK9 in HepG2 trattate con Inclisiran. *Pag 108*
- Figura 49.* Espressione genica di LDLR e PCSK9 in HepG2 trattate con Inclisiran. *Pag 109*
- Figura 50.* Quantificazione di PCSK9 secreta nel mezzo di coltura da HepG2 trattate con Inclisiran. *Pag 110*
- Figura 51.* Espressione proteica di LDLR e PCSK9 in HepG2 trattate con Inclisiran seguendo regime time course. *Pag 112*
- Figura 52.* Espressione genica di LDLR e PCSK9 in HepG2 trattate con Inclisiran seguendo regime time course. *Pag 113*
- Figura 53.* Quantificazione di PCSK9 secreta nel mezzo di coltura da HepG2 trattate con Inclisiran seguendo regime time course. *Pag 114*
- Figura 54.* Riduzione percentuale di LDL-C a 3 mesi nel registro INCLIVEN. *Pag 115*
- Figura 55.* Espressione proteica di LDLR e PCSK9 in HepG2 trattate con Inclisiran + Simvastatina. *Pag 116*
- Figura 56.* Espressione genica di LDLR e PCSK9 in HepG2 trattate con Inclisiran + Simvastatina. *Pag 117*
- Figura 57.* Quantificazione di PCSK9 secreta nel mezzo di coltura da HepG2 trattate con Inclisiran + Simvastatina. *Pag 118*

### ***Lista delle tabelle***

- Tabella 1.* Valori target di colesterolo in relazione al rischio cardiovascolare. *Pag 13*
- Tabella 2.* Terapia a base di Statine ad intensità bassa, moderata, alta. *Pag 48*
- Tabella 3.* Parametri farmacocinetici e potenza inibitoria delle Statine attualmente in uso clinico. *Pag 49*
- Tabella 4.* AB I° utilizzati nel Western Blotting. *Pag 92*

### ***Lista delle equazioni***

- Equazione 1.* Calcolo della densità cellulare tramite camera Bürker. *Pag 80*
- Equazione 2.* Volume di sospensione cellulare da prelevare per ottenere la densità desiderata. *Pag 81*



# 1. Introduzione

## 1.1 Colesterolo

Il colesterolo (Fig.1) è una molecola lipidica essenziale per la fisiologia cellulare dell'organismo umano. Costituente strutturale fondamentale delle membrane cellulari, precursore di ormoni steroidei, acidi biliari e vitamina D, il colesterolo svolge ruoli biologici cruciali nella regolazione della fluidità e della permeabilità di membrana, nonché nella crescita e nello sviluppo fetale durante la gravidanza<sup>1</sup>.

Chimicamente possiede un nucleo steranico, costituito dal peridro-1,2-ciclopentano-fenantrene, con un doppio legame tra C5-C6 e una catena laterale iso-octilica in C17. Sul C3 del primo anello di atomi di carbonio è presente il gruppo ossidrilico (-OH) che conferisce un carattere anfifilico alla molecola (Fig.1).

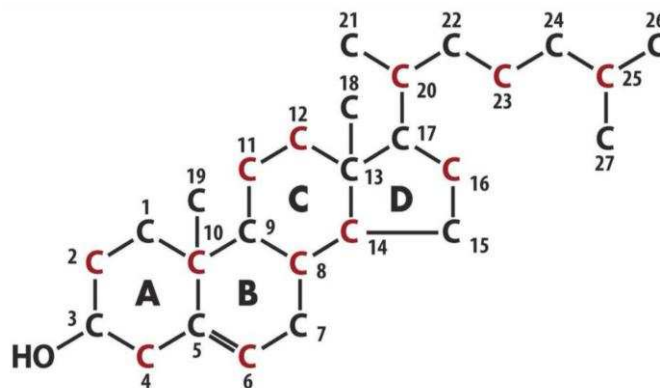


Fig. 1 – Struttura chimica del colesterolo.

### 1.1.1 Sintesi del colesterolo

La biosintesi del colesterolo ha inizio partendo dalla molecola dell'acetil-CoA. Nelle fasi iniziali, tre molecole di acetil-CoA vengono condensate per formare l'acido mevalonico, in una serie di reazioni catalizzate prima dall'enzima idrossi-metil-glutaril-Coenzima A (HMG-CoA) sintasi e poi dall'enzima HMG-CoA reductasi, proteina integrale di membrana del reticolo endoplasmatico liscio, principale regolatore della via biosintetica

del colesterolo (Fig.2). L'acido mevalonico viene quindi convertito in due unità isopreniche attivate, l'isopentenil pirofosfato ed il dimetilallil pirofosfato, quest'ultimo generato dall'isomerizzazione della prima unità isoprenica.

Seguono una serie di reazioni di condensazione "testa-coda" tra unità isopreniche, che portano alla formazione di intermedi progressivamente più complessi: geranil pirofosfato, farnesil pirofosfato e infine squalene, un idrocarburo lineare polinsaturo (Fig.2).

Nelle fasi finali del processo, lo squalene va incontro a una ciclizzazione enzimatica. In un primo momento la squalene monoossigenasi lo ossida a 2,3-ossidosqualene, in seguito la lanosterolo sintasi, sfruttando l'elevata reattività dell'eossido e la precisa disposizione spaziale dei gruppi chimici, guida la trasformazione dalla catena lineare alla struttura ciclica, generando il lanosterolo. Tramite un complesso pathway biochimico di circa 20 reazioni, viene infine convertito in colesterolo (Fig.2). Data la complessità e l'elevato consumo energetico del pathway biosintetico, l'organismo integra la propria richiesta di colesterolo anche tramite l'assorbimento intestinale di quello introdotto con la dieta. I due pathway (endogeno ed esogeno) sono finemente regolati a livello cellulare e a livello sistemico.

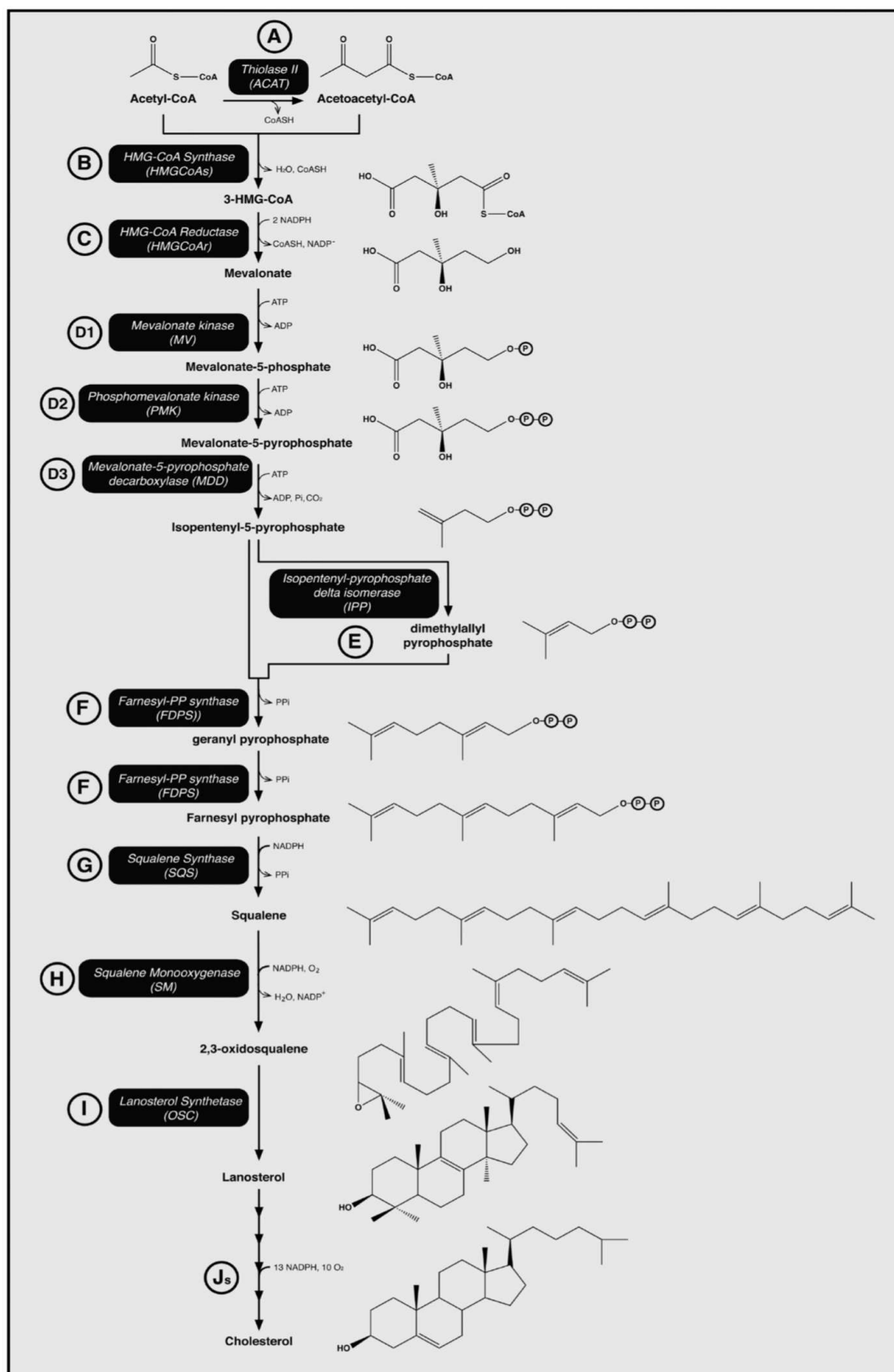


Fig.2 – Processo biochimico della formazione del colesterolo<sup>2</sup>.

### 1.1.2 Lipoproteine

Essendo il colesterolo una molecola lipofila, è insolubile nel sangue. Deve quindi essere trasportato nel circolo ematico da specifici trasportatori, al fine di evitarne la precipitazione. Tali trasportatori sono rappresentati dalle lipoproteine, aggregati macromolecolari costituiti da specifiche proteine, le apolipoproteine, a cui si associano in proporzioni diverse fosfolipidi, colesterolo libero, esteri del colesterolo (CE, cholesterol esters) e triacilgliceroli (TAG). Al loro interno viene racchiuso il nucleo idrofobico lipidico, costituito da CE e TAG, mentre all'esterno le catene laterali degli amminoacidi (AA) idrofilici delle apolipoproteine, le teste idrofobiche dei fosfolipidi e del colesterolo libero. È proprio la differente combinazione di lipidi ed apolipoproteine a generare le varie classi di lipoproteine (Fig. 4)<sup>3</sup>.

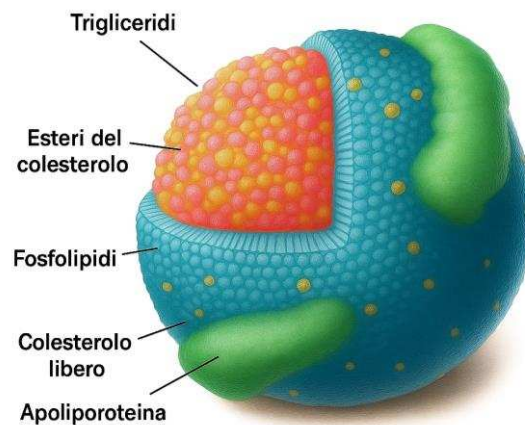


Fig. 3 – Rappresentazione generale di una lipoproteina.

Tra queste, i chilomicroni (CM, chylomicrons) rappresentano la classe di lipoproteine a più bassa densità e maggiori dimensioni, in quanto contengono al loro interno una grande concentrazione di trigliceridi (Fig. 4). Vengono sintetizzati nel reticolo endoplasmatico liscio degli enterociti, a partire dai grassi introdotti con la dieta. Sfruttano quindi il sistema linfatico per entrare nel circolo sanguigno, dove, grazie alle lipoproteine apoB-48, apoE e soprattutto apoC-II, trasportano gli acidi grassi ingeriti con la dieta ai tessuti target. Le “rimanenze” di chilomicroni, ormai prive di TAG ma con ancora colesterolo, apoB-48 ed apoE, si spostano nel fegato, dove vengono captate ed inglobate all'interno dell'epatocita per endocitosi. Questa via esogena trasporta il colesterolo della dieta nel fegato.

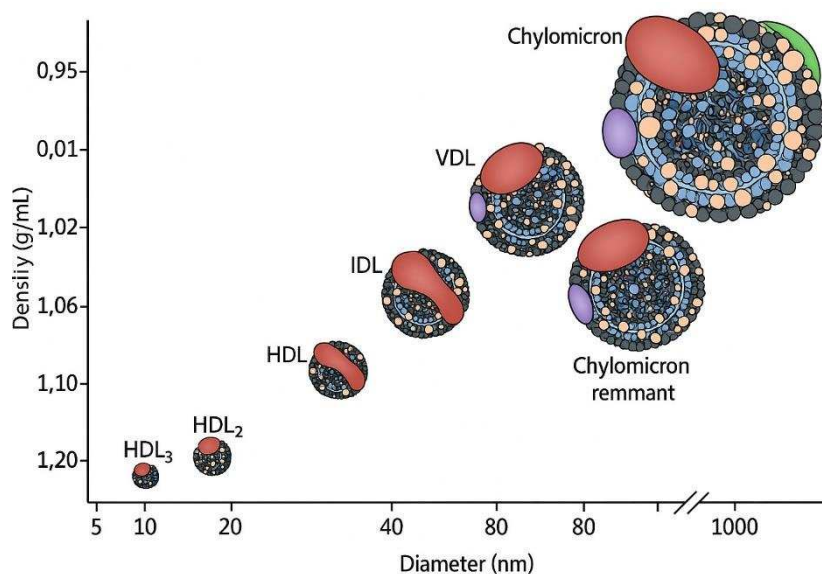


Fig.4 - Classificazione delle principali lipoproteine plasmatiche in base al diametro e alla densità<sup>4</sup>.

Quando l'apporto di acidi grassi e colesterolo eccede i fabbisogni fisiologici dell'organismo, questi vengono metabolizzati nel fegato e convertiti, rispettivamente, in triacilgliceroli e in esteri del colesterolo. Tali lipidi vengono incorporati nelle lipoproteine a densità molto bassa (VLDL, very low-density lipoproteins), che rappresentano il principale sistema di trasporto endogeno dei lipidi verso i tessuti periferici. Le VLDL sono caratterizzate dalla presenza, sulla loro superficie, di diverse apolipoproteine, tra cui apoB-100, apoE e le isoforme di apoC(I-II-III) (Fig.4)<sup>3</sup>.

Dopo la secrezione epatica, le VLDL vengono rilasciate nel circolo ematico e raggiungono tessuti metabolicamente attivi come il muscolo scheletrico ed il tessuto adiposo. In tali distretti, le lipoprotein-lipasi (LPL), ancorate alla superficie endoteliale e attivate principalmente da apoC-II, idrolizzano i triacilgliceroli contenuti nelle VLDL liberando acidi grassi liberi. Questi ultimi possono essere utilizzati dai miociti a scopo energetico mediante  $\beta$ -ossidazione, oppure esterificati e stoccati dagli adipociti sotto forma di gocce lipidiche intracellulari<sup>3</sup>.

La perdita di trigliceridi ed esteri del colesterolo converte le VLDL in lipoproteine a densità intermedia (IDL, intermediate-density lipoproteins), che attraverso ulteriori rimozioni di triacilgliceroli vengono convertite in lipoproteine a bassa densità (LDL) (Fig.4). Quest'ultima classe è molto ricca in colesterolo e dei suoi esteri, ed espone nella sua superficie solamente apoB-100. Le LDL trasportano quindi il colesterolo ai tessuti

periferici, principalmente extraepatici, muscolari e tessuto adiposo, ma anche ai macrofagi<sup>3</sup>.

Le LDL non captate dai tessuti periferici vengono quindi riconosciute e internalizzate dal fegato attraverso il recettore specifico per le LDL (LDLR, low-density lipoproteins), dove il colesterolo viene utilizzato per la sintesi di acidi biliari. Questo percorso metabolico, che origina dalle VLDL e culmina con il riassorbimento delle LDL, è definito via endogena del metabolismo e del trasporto del colesterolo.

L'ultima classe di lipoproteine che discuteremo è quella delle lipoproteine ad alta densità (HDL, high-density lipoproteins). Esse originano nel fegato e nell'intestino tenue come particelle di piccole dimensioni, ricche in proteine ma contenenti quantità limitate di colesterolo e prive di esteri del colesterolo. Le HDL contengono principalmente l'apolipoproteina apoA-I, insieme ad altre apolipoproteine e all'enzima lecitina-colesterolo aciltransferasi (LCAT). Questo enzima, localizzato sulla superficie delle HDL precoci, catalizza la formazione di esteri del colesterolo a partire dal colesterolo libero e dalla lecitina (fosfatidilcolina).

LCAT agisce sul colesterolo proveniente dai residui di chilomicroni e VLDL presenti nel circolo ematico, trasformandolo in esteri del colesterolo. Questa reazione favorisce la formazione di un nucleo lipidico all'interno della particella HDL, portandoli ad una struttura sferica, tipica delle HDL mature. Durante la loro maturazione, le HDL sono in grado di prelevare colesterolo anche dalle cellule extraepatiche, come macrofagi e cellule schiumose, contribuendo così alla rimozione del colesterolo in eccesso. Una volta mature, le HDL ritornano al fegato, dove rilasciano il colesterolo attraverso il recettore SR-BI (scavenger receptor class B type I). In questa interazione avviene un trasferimento selettivo di colesterolo e altri lipidi all'interno della cellula. La maggior parte del colesterolo recuperato viene convertita in sali biliari a livello epatico, per poi essere accumulata e conservata nella cistifellea. Una volta ceduti questi componenti, le HDL si staccano dal recettore e rientrano nel circolo sanguigno, ripetendo il giro. Questo processo è noto come trasporto inverso del colesterolo.

L'assorbimento, il trasporto e il metabolismo del colesterolo sono quindi regolati da una complessa rete di vie metaboliche e attori molecolari, il cui coordinamento è essenziale per il mantenimento dell'omeostasi lipidica (Fig.5). Tuttavia, questo equilibrio può essere facilmente compromesso da fattori genetici, ambientali o patologici, determinando alterazioni significative del profilo lipidico plasmatico. Tali alterazioni sono comunemente indicate con il termine dislipidemie, e rappresentano una condizione clinica di rilevanza, in quanto correlate ad un aumentato rischio cardiovascolare e ad altre gravi complicanze sistemiche.

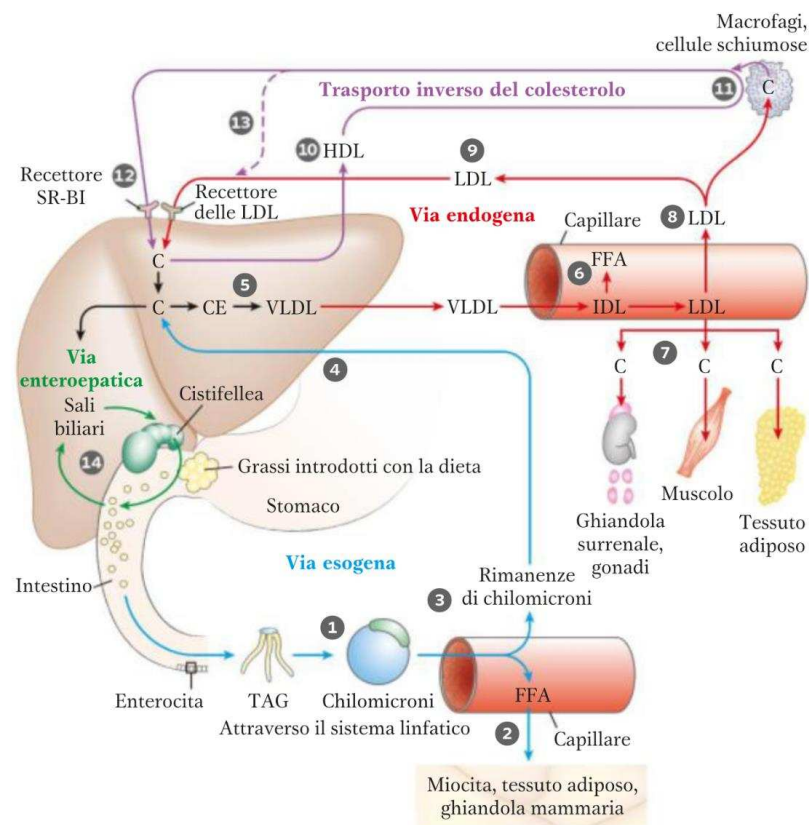


Fig. 5 – Le lipoproteine ed il trasporto lipidico<sup>5</sup>.

## ***1.2 Dislipidemie***

La dislipidemia è una condizione metabolica caratterizzata da concentrazioni anomale di uno o più lipidi plasmatici, tra cui trigliceridi, colesterolo, fosfolipidi o delle relative lipoproteine. Rappresenta uno dei principali fattori di rischio per l'insorgenza di malattie cardiovascolari su base aterosclerotica, quali cardiopatia ischemica, patologia cerebrovascolare e arteriopatia periferica<sup>6</sup>.

Nei Paesi industrializzati, la forma più comune di dislipidemia è rappresentata dalle iperlipidemie, ossia da un incremento patologico dei livelli ematici di lipidi, in particolare del colesterolo LDL e/o dei trigliceridi. L'ipercolesterolemia può essere primaria, secondaria ad un'altra patologia o a condizione multifattoriale.

Con il termine ipercolesterolemia primaria si indica una condizione patologica caratterizzata da un significativo aumento dei livelli plasmatici di colesterolo LDL ( $\geq 130$  mg/dL, ovvero  $\geq 3,4$  mmol/L), spesso associato ad una marcata familiarità per dislipidemie e patologie cardiovascolari precoci. Alla base vi è, nella maggior parte dei casi, un'alterazione funzionale o una ridotta espressione del recettore per le LDL, per lo più associata a mutazioni nel gene LDLR. Tale difetto comporta una ridotta clearance delle LDL da parte degli epatociti, con conseguente accumulo di colesterolo nel circolo ematico.

L'ipercolesterolemia primaria comprende anche l'ipercolesterolemia primaria idiopatica, condizione nella quale i livelli di LDL sono molto alti ( $\geq 190$  mg/dL; 4,9 mmol/L) in assenza di caratteristiche genetiche o condizioni secondarie che possano indurre tali livelli di colesterolo. Essendo idiopatica non se ne conosce l'origine ed i motivi per la quale si sviluppa, anche se si ipotizzano meccanismi epigenetici o varianti genetiche non ancora identificate.

Quando si fa riferimento alle forme secondarie l'aumento del colesterolo LDL rappresenta una conseguenza di altre patologie o condizioni cliniche. Tra le principali cause secondarie vi sono la gravidanza, l'ipotiroidismo, la sindrome nefrosica, anoressia nervosa o colestasi, il diabete mellito non controllato e l'uso cronico di alcuni farmaci (come i glucocorticoidi o i diuretici tiazidici). In questi casi, la correzione della causa può normalizzare i livelli lipidici.

L'ipercolesterolemia multifattoriale è la più frequente nella popolazione generale, presentante valori LDL-C  $\geq 130$  mg/dL ( $\geq 3,4$  mmol/L). L'insorgenza è dettata dall'interazione tra fattori genetici poligenici (ossia la somma di numerose varianti genetiche a bassa penetranza) e fattori ambientali come dieta ricca di grassi saturi, sedentarietà, fumo di sigaretta e sovrappeso. In questa forma, l'alterazione del profilo lipidico tende a manifestarsi in età adulta e può essere modulata significativamente dallo stile di vita.

L'ipercolesterolemia familiare (FH) è una patologia genetica ereditaria, causata prevalentemente da mutazioni a carico del gene che codifica per il recettore delle lipoproteine a bassa densità. Questo recettore svolge un ruolo fondamentale nella regolazione del trasporto e del metabolismo del colesterolo. In presenza di mutazioni funzionali, si verifica una compromissione del meccanismo di feedback che regola i livelli ematici di colesterolo, determinandone un accumulo plasmatico. Tale condizione è alla base dell'insorgenza precoce dell'aterosclerosi e di un incremento significativo del rischio cardiovascolare.

Si tratta di una delle malattie autosomiche dominanti più comuni: si stima che circa un individuo su 500 sia eterozigote per la mutazione, presentando livelli di colesterolo totale nel sangue da due a tre volte superiori ai valori normali (310-580 mg/dL), riconducibili a mutazioni genetiche di LDLR, ApoB o PCSK9. Nei soggetti omozigoti, portatori di due alleli mutati con incidenza di 1: 1 000 000, il quadro clinico è molto più severo: le concentrazioni plasmatiche di colesterolo possono essere fino a cinque o sei volte più alte rispetto alla norma (460-1160 mg/dL), interessando anche i geni per ApoE. In questi pazienti si osservano frequentemente xantomi cutanei e un'evidente compromissione vascolare, con interessamento delle arterie coronariche, cerebrali e periferiche con un alto rischio di sviluppare infarto del miocardio prima dei vent'anni.

La genetica alla base dell'ipercolesterolemia familiare è estremamente complessa. Sono state identificate più di 1400 mutazioni a carico del gene per il recettore delle LDL, le quali possono essere suddivise in cinque gruppi (Fig.6)<sup>7</sup>:

- le mutazioni di classe I sono piuttosto rare e portano a una completa assenza di sintesi della proteina recettoriale (allele nullo).

- Le mutazioni di classe II codificano per proteine recettoriali che, non potendo essere trasportate al complesso del Golgi, si accumulano nel reticolo endoplasmatico.
- Le mutazioni di classe III riguardano il dominio del recettore che lega le LDL: le proteine codificate raggiungono la superficie cellulare ma non riescono a legare le LDL o lo fanno con una scarsa affinità.
- Le mutazioni di classe IV codificano per proteine correttamente sintetizzate e trasportate verso la superficie cellulare, le quali legano normalmente le LDL ma non riescono a collocarsi nelle fossette rivestite di clatrina e di conseguenza, le LDL legate non vengono fagocitate.
- Le mutazioni di classe V codificano per proteine che sono espresse sulla superficie cellulare, possono legare le LDL e possono essere internalizzate; tuttavia, non si verifica la dissociazione pH-dipendente tra recettore e LDL legate. I recettori restano intrappolati negli endosomi, dove vengono degradati, senza riuscire dunque a riportarsi sulla superficie cellulare<sup>7</sup>.

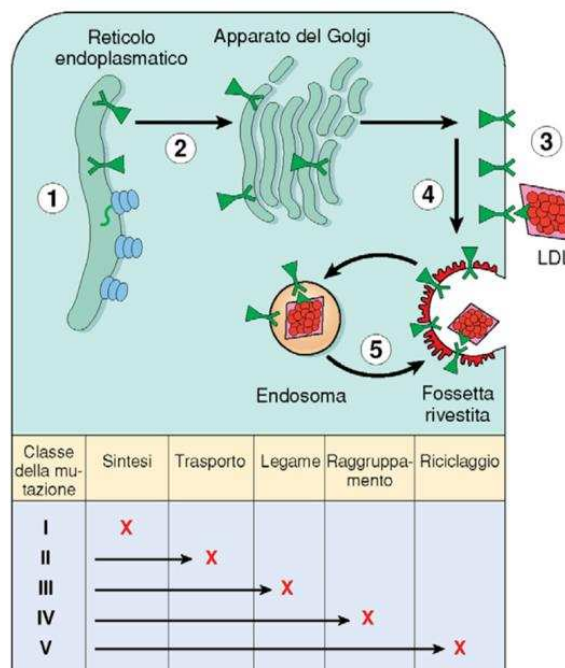


Fig. 6 - Principali classi di mutazione del recettore per le LDL, responsabili di difetti funzionali<sup>8</sup>.

L'ipercolesterolemia può essere controllata attraverso terapie ipolipemizzanti, soprattutto se associate a un'alimentazione equilibrata e a un regolare esercizio fisico. Tuttavia, nonostante l'intervento farmacologico, una quota rilevante di pazienti, sia affetti da ipercolesterolemia familiare sia da forme non familiari, non riesce ancora a raggiungere i

valori target di colesterolo LDL raccomandati. In quest'ottica, l'urgenza di sviluppare approcci terapeutici più mirati ed innovativi, si prefissa come una delle tematiche principali della ricerca scientifica<sup>9</sup>.

### **1.2.1 Metodi di misura del colesterolo**

#### *Colesterolo totale*

Nei laboratori di analisi, la quantificazione del colesterolo totale (CT) viene effettuata tramite il metodo enzimatico CHOD/POD/Trinder.

Questa tecnica analitica sfrutta le colesterol ossidasi (CHOD), le perossidasi (POD) ed il reattivo di Trinder per formare un prodotto cromogeno colorato, la cui intensità è proporzionale alla concentrazione di colesterolo presente nel campione di siero o plasma.

Il valore desiderabile di CT è  $\leq 5,00$  mmol/L ( $\leq 190$  mg/dL)<sup>10</sup>.

#### *Colesterolo LDL*

Comunemente viene calcolato con la formula di Friedewald:

- in mmol/L:  $LDL-C = CT - HDL-C - (Trigliceridi/2,2)$ ;
- in mg/dL:  $LDL-C = CT - HDL-C - (Trigliceridi/5)$ ;

Negli ultimi anni sono stati sviluppati metodi diretti (di tipo immunologico o con ultracentrifuga) per la determinazione del LDL-C i cui valori risultano in accordo con quelli ottenuti con la formula. Queste nuove metodiche sembrerebbero avere prestazioni analitiche superiori alla formula di Friedewald ma, così come per la formula di Friedewald, non possono essere applicati in presenza di elevati valori di TG.

Nello specifico, in base alla condizione del soggetto, i valori desiderabili sono:

- $\leq 3,00$  mmol/L o  $\leq 115$  mg/dL in persone sane non affette da CVD e senza altri fattori di rischio secondari;
- $\leq 2,60$  mmol/L o  $\leq 100$  mg/dL in persone con altri fattori di rischio per CVD ma senza malattie cardiovascolari in atto o pregresse;
- $\leq 1,8$  mmol/L o  $\leq 70$  mg/dL in pazienti con pregresse o con in atto malattie cardiovascolari.<sup>10</sup>

#### *Colesterolo HDL*

In passato, il HDL-C era determinato tramite metodi basati sulla precipitazione selettiva delle lipoproteine contenenti apoB (VLDL e LDL). Successivamente, il colesterolo residuo presente nel surnatante veniva quantificato con metodi enzimatici.

Anche per HDL-C, i metodi tradizionali sono stati sostituiti da metodi “diretti” che consentono il dosaggio in fase omogenea.

I valori desiderabili sono:

- $\geq 1,00$  mmol/L o  $\geq 40$  mg/dL per i maschi;
- $\geq 1,20$  mmol/L o  $\geq 45$  mg/dL per le femmine;

Per valutare correttamente il rischio cardiovascolare si deve considerare l'indice di rischio, cioè il rapporto CT/HDL-C ed il rapporto LDL-C/HDL-C. Il primo, nei soggetti sani, deve essere  $<5$  per i maschi e  $<4,5$  per le femmine; il secondo si definisce basso quando il rapporto è 1,47, medio 3,22, moderato 5,0 e alto 6,14<sup>10</sup>.

### *Trigliceridi*

Vengono determinati tramite metodi enzimatici che misurano il glicerolo libero prodotto dall'idrolisi dei TG. Sebbene questi metodi misurino anche il glicerolo libero ottenuto dall'idrolisi, mediata dalle lipasi, dei TG circolanti, la sua concentrazione è normalmente trascurabile.

I trigliceridi presentano una variabilità biologica intraindividuale molto elevata. Il fumo, l'esercizio fisico e l'alcol sono in grado di modificare i livelli di TG e, pertanto, prima di eseguire il prelievo, è importante prendere delle accortezze.

I valori desiderabili sono  $\leq 1,70$  mmol/L o  $\leq 150$  mg/dL<sup>10</sup>.

Total CV risk	Untreated LDL-C levels					
	<1.4 mmol/L (<55 mg/dL)	1.4 to <1.8 mmol/L (55 to <70 mg/dL)	1.8 to <2.6 mmol/L (70 to <100 mg/dL)	2.6 to <3.0 mmol/L (100 to <116 mg/dL)	3.0 to <4.9 mmol/L (116 to <190 mg/dL)	≥4.9 mmol/L (≥190 mg/dL) <sup>a</sup>
<b>Low</b>	Lifestyle advice	Lifestyle advice	Lifestyle advice	Lifestyle advice	Lifestyle modification, consider adding drug if uncontrolled	N/A <sup>a</sup>
<b>Moderate</b>	Lifestyle advice	Lifestyle advice	Lifestyle advice	Lifestyle modification, consider adding drug if uncontrolled	Lifestyle modification, consider adding drug if uncontrolled	N/A <sup>a</sup>
<b>High</b>	Lifestyle advice	Lifestyle advice	Lifestyle modification, consider adding drug if uncontrolled	Lifestyle modification and concomitant drug intervention	Lifestyle modification and concomitant drug intervention	Lifestyle modification and concomitant drug intervention
<b>Very high: primary prevention</b>	Lifestyle modification, consider adding drug	Lifestyle modification, consider adding drug	Lifestyle modification and concomitant drug intervention	Lifestyle modification and concomitant drug intervention	Lifestyle modification and concomitant drug intervention	Lifestyle modification and concomitant drug intervention
<b>Very high: secondary prevention</b>	Lifestyle modification and concomitant drug intervention	Lifestyle modification and concomitant drug intervention	Lifestyle modification and concomitant drug intervention	Lifestyle modification and concomitant drug intervention	Lifestyle modification and concomitant drug intervention	Lifestyle modification and concomitant drug intervention

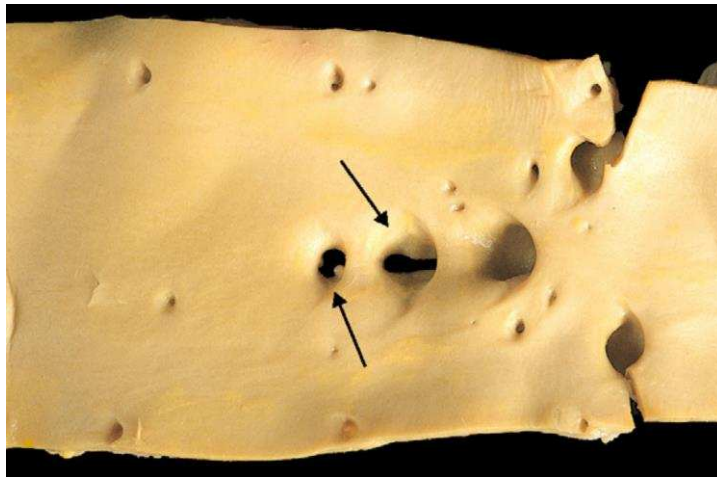
Tabella. 1 - Valori target di colesterolo LDL in relazione al rischio cardiovascolare globale dell'individuo, secondo le raccomandazioni EAS/ESC. La tabella mostra gli intervalli desiderabili di colesterolo LDL in funzione del rischio cardiovascolare totale. Per ciascun livello di rischio (basso, moderato, alto, molto alto in prevenzione primaria e molto alto in prevenzione secondaria) vengono indicate le strategie di gestione: dal solo intervento sullo stile di vita, fino alla necessità di associare modifiche dello stile di vita ad una terapia farmacologica concomitante<sup>11</sup>.

### ***1.3 Aterosclerosi***

L'aterosclerosi è la principale causa di morte sia nei paesi sviluppati che in quelli in via di sviluppo e si stima che 17,9 milioni di persone muoiano ogni anno a causa di malattie cardiovascolari, rappresentando il 32% di tutti i decessi secondo il rapporto dell'Organizzazione Mondiale della Sanità<sup>3</sup>.

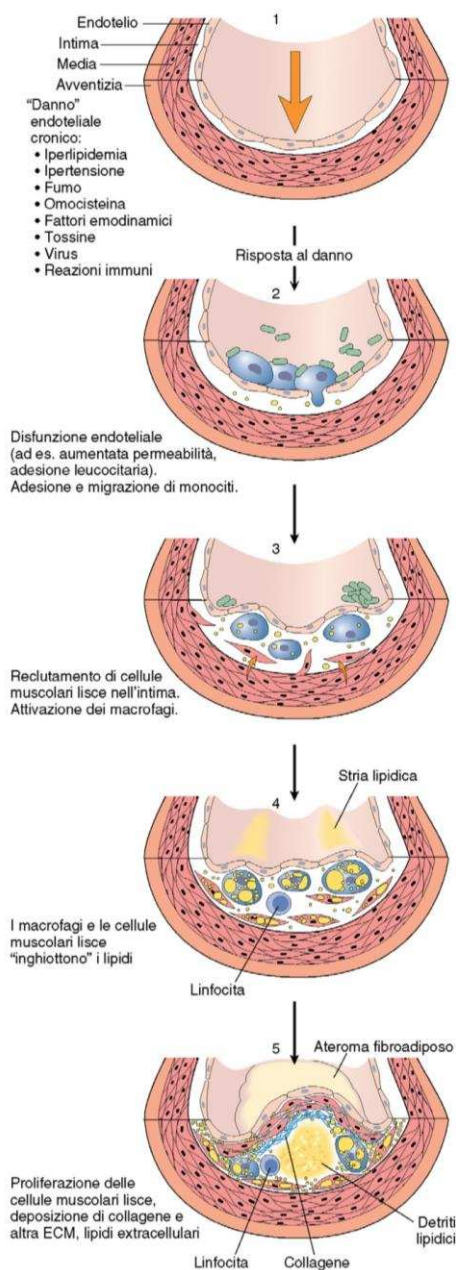
Il termine "aterosclerosi" è stato proposto per la prima volta da Felix Marchand nel 1904, il quale ha suggerito che l'aterosclerosi fosse responsabile dell'indurimento delle arterie elastiche (aorta) e muscolari, ed è spesso caratterizzata da alterazioni ateromatose.<sup>12</sup> La parola greca "athere", prefisso di aterosclerosi, significa 'poltiglia' o 'pappa' e sta ad indicare il deposito di lipidi nella parete arteriosa, mentre il suffisso "sclerosi" si riferisce all'indurimento.

L'accumulo di lipidi, soprattutto colesterolo, nelle pareti dei vasi sanguigni è la caratteristica principale dell'aterosclerosi, alla quale si affianca una costante infiammazione dei tessuti dovuto all'interazione delle lipoproteine aterogene con le cellule della parete vascolare, monociti/macrofagi, linfociti e mastociti. Queste placche aterosclerotiche causano il restringimento delle arterie, che può limitare o interrompere il flusso sanguigno e l'apporto d'ossigeno ai tessuti<sup>13</sup>.



*Fig. 7 - Sezione di aorta con strie lipidiche (freccie), distribuite prevalentemente in prossimità delle diramazioni vascolari<sup>8</sup>.*

Dal punto di vista morfologico le strie lipidiche (Fig. 7) costituiscono la lesione più precoce dell'aterosclerosi. Si presentano come piccole macule giallastre e piatte, che tendono a



confluire formando strie allungate, generalmente non superiori a qualche centimetro. Queste lesioni sono riscontrabili già nei primi anni di vita: si osservano infatti nell'aorta di bambini di età inferiore a un anno e, in modo pressoché universale, nei bambini di età superiore ai 10 anni. Non tutte le strie lipidiche evolvono necessariamente in placche aterosclerotiche. Alcune, come le strie localizzate nelle arterie coronarie, sembrano avere una maggiore probabilità di evoluzione verso forme avanzate, specie se localizzate in regioni suscettibili come i punti di biforcazione o di flusso turbolento, dove si crea un ambiente pro-infiammatorio favorevole alla progressione della placca. Con il progredire della patologia, si assiste all'ispessimento dell'intima e all'accumulo di lipidi extracellulari ed intracellulari, determinando la formazione della placca aterosclerotica vera e propria (Fig.8). Questa appare come un ispessimento del lume arterioso di colore giallo-biancastro o rosso-bruno, se c'è la compresenza di ulcerazioni o sovrapposizione trombotica<sup>8</sup>.

Fig. 8 - Evoluzione della parete arteriosa, da una condizione normale ad una placca molto sviluppata<sup>8</sup>.

Le placche possono avere dimensioni che vanno da 0,3 a 1,5 cm di diametro, anche se frequenti sono le sovrapposizioni di più placche che portano a lesioni molto più estese. Sono di norma focali ed eccentriche, ed interessano solo porzioni della parete arteriosa, una caratteristica legata all'emodinamica locale<sup>8</sup>.

### 1.3.1 Meccanismo molecolare

Entrando più nello specifico, le particelle LDL, soprattutto se abbondanti, si accumulano nell'intima o nello spazio subendoteliale della parete arteriosa. Questa fase dipende principalmente dalla permeabilità/integrità dell'endotelio, alterata da fattori genetici, stress ossidativo e meccanico ed infezioni. Una volta nell'intima, lo stress ossidativo dovuto alla presenza di specie reattive dell'ossigeno porta all'ossidazione del nucleo lipidico delle LDL. L'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi delle LDL libera aldeidi e chetoni, che modificano i residui di lisina dell'ApoB-100. L'ApoB-100 modificata non è più riconosciuta dal recettore LDL, impedendo la sua rimozione dalla circolazione attraverso la via classica del recettore LDL. La presenza di LDL ossidate (oxLDL) nella parete arteriosa innesca il reclutamento di macrofagi, i quali assorbono le oxLDL attraverso i loro recettori scavenger trasformandosi in cellule schiumose. Questo processo promuove la produzione e il rilascio di citochine da parte delle cellule endoteliali e muscolari lisce e dei macrofagi che potenziano ulteriormente l'infiammazione e il reclutamento dei macrofagi nel sito. I macrofagi non sono in grado di processare le oxLDL e finiscono per rompersi depositando altro colesterolo ossidato nella parete dell'arteria. Di conseguenza, altri macrofagi vengono inviati nell'area, ripetendo il ciclo<sup>9</sup>.

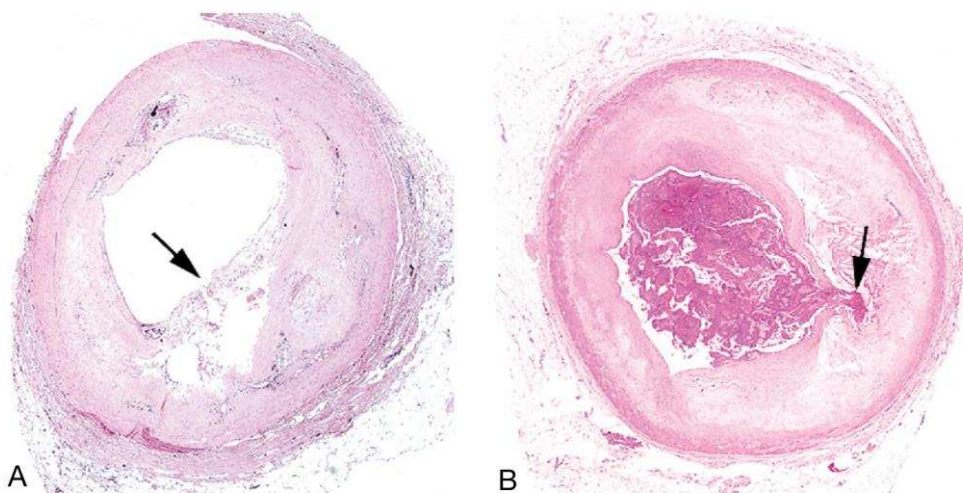


Fig. 9 – (A). Rottura di placca con trombosi sovrapposta in un paziente deceduto improvvisamente. (B). Trombosi coronarica acuta associata ad una placca aterosclerotica caratterizzata da rottura focale del cappuccio fibroso<sup>8</sup>.

Mentre il processo continua e ulteriori lipidi si accumulano nell'intima, si forma un tappo fibroso, composto principalmente da cellule muscolari lisce, che separa la placca

aterosclerotica dal flusso sanguigno. Col tempo, ciò comporta un restringimento dell'arteria che riduce il flusso sanguigno e aumenta la pressione arteriosa<sup>9</sup>.

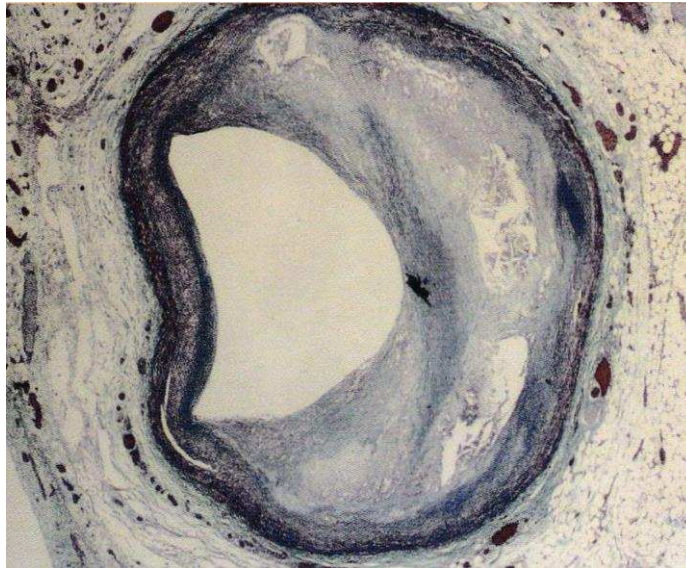
### ***1.3.2 Placca aterosclerotica***

La placca aterosclerotica (Fig.10) è il segno distintivo dell'aterosclerosi. Queste placche possono essere distinte in due categorie principali: stabili e instabili. Le placche stabili tendono ad evolvere lentamente nel tempo, con possibilità di regressione, di mantenimento dello stato attuale o di progressiva crescita nel corso di decenni, fino a determinare una stenosi significativa o, in alcuni casi, un'occlusione completa del lume vascolare. Al contrario, le placche instabili rappresentano una condizione clinicamente più pericolosa, poiché possono andare incontro a processi acuti quali erosione endoteliale, fissurazione o rottura del cappuccio fibroso. Questi eventi innescano una cascata trombotica che può portare rapidamente all'occlusione vascolare e all'infarto, spesso prima ancora che si sviluppi una stenosi emodinamicamente rilevante.

È stato dimostrato che la maggior parte degli eventi cardiovascolari acuti, quali infarto del miocardio e ictus ischemico, deriva da placche instabili che, paradossalmente, possono apparire modeste o non critiche all'angiografia. Di conseguenza, l'obiettivo terapeutico di stabilizzare le placche vulnerabili è di fondamentale importanza per la prevenzione primaria e secondaria delle sindromi coronariche acute, con un impatto diretto sulla riduzione della morbilità e della mortalità cardiovascolare.

La resistenza meccanica del cappuccio fibroso e la sua capacità di contenere il nucleo lipidico dipendono da un delicato equilibrio tra sintesi e degradazione del collagene, regolato da diversi tipi cellulari presenti nella placca. Tra questi, mediatori dell'infiammazione come i linfociti T e macrofagi sembrano avere un ruolo di prim'ordine. I macrofagi sono in grado di secernere numerose classi di proteasi, tra cui le metalloproteinasi della matrice (MMP), oltre che catepsine e collagenasi, che destabilizzano le placche se sovraesposte<sup>14</sup>. I linfociti T, dal canto loro, rilasciano

interferone gamma (INF-  $\gamma$ ), una citochina che si è dimostrato inibire la proliferazione della cellule muscolari lisce della tonaca, oltre che regolare la produzione di MMP<sup>15</sup>.



*Fig. 10 - Arteria coronaria stenotica per la presenza di una placca aterosclerotica<sup>16</sup>.*

Oltre all'azione diretta degli enzimi proteolitici, le citochine pro-infiammatorie rilasciate nel microambiente della placca contribuiscono a ridurre la sintesi di collagene da parte delle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC), che normalmente svolgono una funzione protettiva rinforzando la struttura della placca. La rottura del cappuccio fibroso espone il contenuto altamente trombogenico del core lipidico al sangue circolante, attivando la cascata coagulativa. Inoltre, i macrofagi stessi contribuiscono all'attivazione del processo trombotico grazie alla presenza di fattore tissutale, in grado di favorire localmente la formazione di trombina. Sembrerebbe essere quindi la sinergia tra questi mediatori cellulari la chiave della patogenesi aterosclerotica<sup>15</sup>.

### ***1.3.3 Conseguenze dell'aterosclerosi***

Le principali conseguenze alle quale si può incorrere se non si interviene efficacemente in prevenzione o nel trattamento della patologia sono le seguenti:

- **Calcificazione:** caratterizzata da un accumulo anomalo di sali di calcio all'interno della tonaca intima delle arterie, i quali determinano la perdita di elasticità e l'alterazione dell'integrità strutturale della parete vascolare. A livello molecolare,

tale processo è strettamente associato alla necrosi cellulare che si sviluppa nelle fasi avanzate dell'aterosclerosi. Le cellule necrotiche rilasciano nel microambiente circostante una serie di molecole pro-infiammatorie e strutturali, tra cui le PAR (poly(ADP-ribose)), polimeri sintetizzati in seguito all'iperattivazione dell'enzima PARP (poly(ADP-ribose)polimerasi), attivato in condizioni di stress ossidativo e danno al DNA<sup>8</sup>.

Le PAR presentano un'elevata affinità per gli ioni calcio, con cui formano complessi insolubili che tendono ad aggregarsi e a dar luogo alla formazione di cristalli di calcio. Questi ultimi si vanno a depositare in corrispondenza delle strutture elastiche della parete arteriosa, come le lamelle elastiche, contribuendo al processo di irrigidimento vascolare. L'accumulo di calcio comporta, da un lato, una riduzione della compliance vascolare, compromettendo la capacità del vaso di adattarsi alle variazioni pressorie, dall'altro, il progressivo indurimento della parete arteriosa ne aumenta la fragilità, rendendola maggiormente predisposta a rottura in presenza di stress emodinamici, o instabilità meccanica della placca aterosclerotica<sup>8</sup>.

- *Angina pectoris*: è un dolore toracico che si localizza solitamente dietro lo sterno e può irradiarsi verso la spalla e il braccio sinistro. Il dolore è causato da una riduzione del flusso di sangue nelle arterie coronarie, dovuta ad un restringimento o un'ostruzione del vaso, che impedisce un adeguato apporto di ossigeno al miocardio nei momenti in cui la richiesta metabolica aumenta, come durante uno sforzo fisico. Questa condizione determina un'ischemia miocardica transitoria, lieve e reversibile, che tende a risolversi con il riposo o mediante la somministrazione di nitroglicerina. Quest'ultima, una volta assunta, viene trasformata in ossido nitrico, una molecola in grado di rilassare la muscolatura liscia dei vasi sanguigni, portandoli a dilatazione<sup>8</sup>.
- *Occlusione acuta*: la rottura o l'erosione di una placca ateromatosa può innescare la formazione di un trombo occlusivo che interrompe bruscamente il flusso ematico, determinando necrosi ischemica del tessuto a valle. La gravità del danno dipende dal diametro del vaso che si andrà ad occludere, e dalla presenza di collaterali. Le conseguenze includono infarto miocardico, ictus cerebrale, gangrena intestinale o

degli arti inferiori. In alcuni casi, il trombo può essere dissolto tramite attivatori della fibrinolisi come la streptochinasi o l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA)<sup>8</sup>.

- *Stenosi cronica*: l'ingrandimento progressivo della placca può ridurre il lume vascolare, compromettendo il flusso sanguigno e causando ischemia cronica dell'organo irrorato. Esempi includono: atrofia renale da stenosi dell'arteria renale, ischemia intestinale da aterosclerosi mesenterica, e lesioni cutanee ischemiche nei pazienti diabetici con arteriopatia periferica avanzata<sup>8</sup>.
- *Aneurisma*: le placche instabili possono danneggiare la tonaca media, indebolendo la parete vascolare e favorendo la formazione di aneurismi, tipicamente nell'aorta addominale. La rottura di un aneurisma rappresenta un'emergenza vascolare potenzialmente letale<sup>8</sup>.
- *Embolia*: un trombo formatosi su una placca può frammentarsi e generare emboli che occludono vasi distali. Un esempio clinico è l'occlusione acuta dell'arteria poplitea mediata da embolo derivante da un aneurisma aortico, con conseguente gangrena dell'arto<sup>8</sup>.

### **1.3.4 Biomarcatori**

- *Marcatori lipoproteici*: l'apolipoproteina B (apoB) costituisce un indicatore diretto del numero di particelle aterogene (LDL, VLDL, IDL) e del rischio cardiovascolare. Il suo dosaggio, combinato con quello dell'apolipoproteina A1 (apoA1), consente una valutazione bilanciata tra componenti pro- e anti-aterogene, come evidenziato nello studio INTERHEART. Le lipoproteine ossidate sono strettamente legate all'attività macrofagica e alla formazione della placca, con prodotti ossidativi come oxPL-apoB fortemente correlati alla patologia aterosclerotica<sup>17</sup>.
- *Marcatori di stress ossidativo*: le metalloproteinasi di matrice (MMP-2 e MMP-9) e la mieloperossidasi (MPO) partecipano alla degradazione della matrice extracellulare, contribuendo all'instabilità della placca. Non possono essere però considerate dei marcatori specifici del rischio cardiovascolare, in quanto sono enzimi presenti costitutivamente nel circolo sanguigno e legate a molti processi infiammatori<sup>18</sup>.

- *Marcatori infiammatori*: la proteina C reattiva ad alta sensibilità (hs-PCR) è uno dei biomarcatori più consolidati nella stratificazione del rischio cardiovascolare. Valori superiori a 2 mg/L sono associati a un significativo aumento del rischio di eventi. Tra le citochine infiammatorie, l'interleuchina-6 (IL-6) ha mostrato una correlazione indipendente con stenosi coronariche e rischio futuro. Anche la pentraxina 3 (PTX-3) è risultata un marcatore di instabilità di placca, più specifica rispetto alla PCR nella distinzione tra angina stabile e instabile<sup>15</sup>.
- *Marcatori coagulativi e trombotici*: il fibrinogeno, precursore della fibrina, è stato associato al rischio trombotico e cardiovascolare, sebbene influenzato da numerosi fattori infiammatori. L'omocisteina, aminoacido plasmatico, si associa a un aumento del rischio CV, ma l'efficacia della sua riduzione tramite supplementazione vitaminica resta incerta<sup>19</sup>.
- *Marcatori cardiaci*: le troponine I e T, fondamentali nella diagnosi della sindrome coronarica acuta (SCA), si sono rivelate utili anche come indicatori prognostici in soggetti asintomatici. Il frammento N-terminale del propeptide natriuretico di tipo B (NT-proBNP), comunemente utilizzato nello scompenso cardiaco, ha dimostrato un valore predittivo anche nella popolazione generale<sup>20</sup>.

Sono poi da considerare tutta una serie di fattori di rischio che è stato dimostrato aumentino la probabilità di insorgenza della patologia:

- L'ipertensione arteriosa, sia sistolica che diastolica, rappresenta uno dei principali determinanti di infarto miocardico, con un rischio quasi triplicato nei soggetti con valori sistolici superiori a 160 mmHg rispetto a coloro con valori inferiori a 120 mmHg<sup>21</sup>.
- Il fumo di sigaretta, con effetto dose-dipendente, aggrava la severità dell'aterosclerosi ed aumenta il rischio di infarto, ictus e aneurismi aortici.<sup>21</sup>
- Il diabete mellito, frequentemente associato a dislipidemia e ipertensione, predispone a eventi trombotici su base aterosclerotica<sup>21</sup>.
- L'età avanzata e il sesso maschile agiscono come cofattori di rischio, probabilmente in virtù della loro associazione con altre condizioni patologiche<sup>21</sup>.
- Inattività fisica, stress cronico e iperomocisteinemia<sup>21</sup>.
- Livelli plasmatici elevati di proteina C reattiva indicano una possibile relazione tra infiammazione sistemica e formazione della placca aterosclerotica<sup>21</sup>.

## 1.4 Sindrome coronarica acuta

La sindrome coronarica acuta (ACS) (Fig.11) è una condizione medica grave, determinata nella maggior parte dei casi dalla rottura o dall'erosione di una placca aterosclerotica instabile localizzata a livello delle arterie coronarie. Questo evento comporta l'attivazione della cascata coagulativa con conseguente formazione di trombi che possono occludere parzialmente o completamente il lume del vaso, causando una riduzione del flusso ematico al miocardio e provocando ischemia miocardica<sup>22</sup>.

L'ACS comprende tre principali manifestazioni cliniche:

- angina instabile;
- infarto miocardico senza sopraslivellamento del tratto ST (NSTEMI);
- infarto miocardico con sopraslivellamento del tratto ST (STEMI).

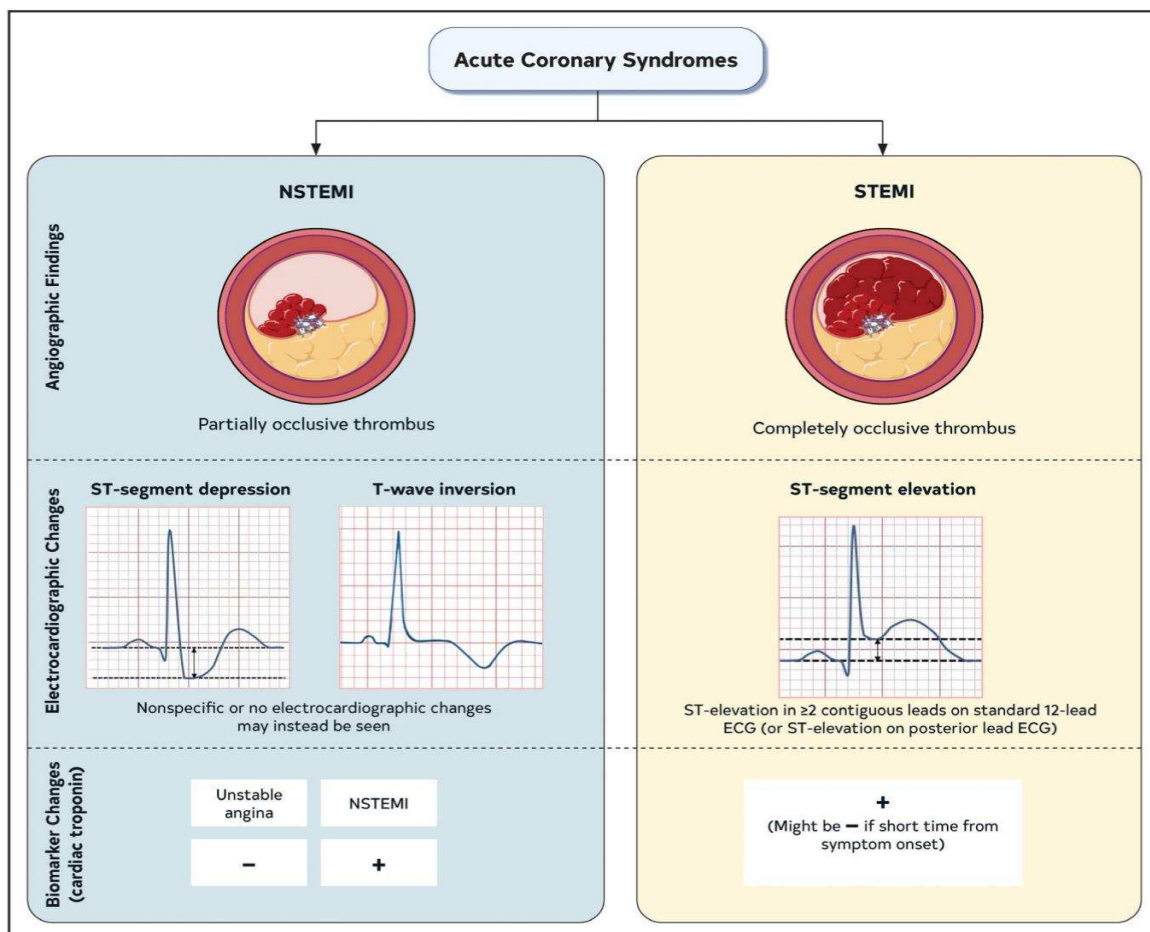


Fig. 11 – Distinzione e classificazione della sindrome coronarica acuta<sup>22</sup>.

La distinzione tra queste condizioni si basa principalmente sull'interpretazione dell'elettrocardiogramma (ECG) e sulla misurazione dei livelli sierici della troponina cardiaca (cTn), il biomarcatore più sensibile e specifico del danno miocardico<sup>22</sup>.

L'angina instabile si manifesta con episodi transitori di ischemia miocardica, in cui il flusso ematico coronarico risulta ridotto, ma non si rilevano segni di necrosi cellulare, come indica il mancato aumento dei biomarcatori sierici, in particolare della troponina. Quando l'ischemia è più prolungata o severa, si ha un danno strutturale del miocardio con rilascio di troponine nel circolo ematico, configurando un infarto miocardico acuto. Nell'infarto miocardico NSTEMI, l'occlusione coronarica è generalmente parziale, e l'ischemia colpisce principalmente le porzioni subendocardiche del miocardio. Al contrario, nell'infarto STEMI, l'occlusione è completa e il danno ischemico interessa l'intera parete ventricolare, determinando un'ischemia transmurale<sup>22</sup>.

È importante sottolineare che l'ACS presenta una fisiopatologia molto dinamica: un paziente può evolvere rapidamente da una forma clinica meno grave (es. angina instabile) a una più severa anche durante le prime fasi del trattamento<sup>22</sup>.

Per questa patologia, l'efficacia del trattamento è strettamente legata alla tempestività dell'intervento. È quindi importante mantenere uno stato di attenzione elevato nei pazienti con sintomi compatibili, come dolore toracico, dispnea o alterazioni emodinamiche. Il rischio di eventi cardiovascolari maggiori è massimo nelle prime ore e nei primi giorni dalla comparsa dell'ACS, ma rimane molto elevato anche nei mesi successivi, a causa della persistenza di uno stato infiammatorio sistemico che può favorire l'andamento della malattia aterosclerotica<sup>22</sup>.

I farmaci maggiormente utilizzati nella fase acuta comprendono: antiaggreganti piastrinici, Statine e ACE-inibitori, mantenuti anche per un anno dopo il manifestarsi di una crisi acuta<sup>22</sup>.

### ***1.4.1 Rottura della placca***

La rottura della placca rappresenta l'evento chiave nella patogenesi dell'infarto miocardico acuto. Si verifica quando la capsula fibrosa, che riveste il nucleo necrotico lipidico, si lacera

o si fessura. Questo fenomeno permette il contatto diretto tra i fattori procoagulanti ematici (come il fibrinogeno o la trombina) e i componenti altamente trombogenici del nucleo lipidico, in particolare il fattore tissutale (TF). Ciò innesca la cascata coagulativa e la formazione di un trombo occludente, responsabile dell'evento ischemico acuto<sup>23</sup>.

Dal punto di vista istopatologico, la placca rotta è caratterizzata da:

- Un nucleo lipidico ampio, ricco di detriti cellulari e macrofagi schiumosi<sup>23</sup>;
- Una capsula fibrosa sottile (<65 µm), composta principalmente da collagene fibrillare di tipo I e III e prodotta dalle VSMC<sup>23</sup>;
- Una ridotta densità di VSMC, che compromette la capacità rigenerativa e strutturale della capsula<sup>23</sup>;

Le cause di questo fenomeno sono molteplici:

L'attivazione dei macrofagi induce il rilascio una grande quantità di enzimi proteolitici, in particolare MMP-1, MMP-8 e MMP-13, le quali sono in grado di scindere il collagene di tipo I e III, essenziale per conferire resistenza meccanica al cappuccio. Inoltre, l'attività proteolitica è amplificata dalla presenza di altri enzimi lisosomiali come la catepsina K e la catepsina S, anch'esse espresse dai macrofagi e capaci di degradare sia elastina che collagene. Il risultato è un assottigliamento progressivo del cappuccio fibroso, che diventa più suscettibile alla fissurazione meccanica e alla successiva esposizione del nucleo necrotico<sup>23</sup>.

L'infiammazione cronica che colpisce questi tessuti svolge sempre un ruolo centrale nello sviluppo delle lesioni. La riduzione delle cellule T regolatorie CD4+ CD25+, essenziali per omeostasi immunitaria, porta a una perdita di controllo dell'infiammazione locale, favorendo l'attivazione continua di macrofagi e l'espressione di MMP<sup>23</sup>.

In altri casi, la rottura della placca può verificarsi in assenza di un'infiammazione sistemica evidente. Stress psicofisico intenso (emozioni forti, dolore acuto, esercizio fisico estremo), stress meccanico locale sulla parete arteriosa, possono destabilizzare una placca già predisposta, provocando la rottura e il conseguente evento ischemico<sup>23</sup>.

### **1.4.2 Erosione della placca**

Al concetto di rottura del cappuccio fibroso si è affiancato, negli ultimi anni, un meccanismo alternativo di sindrome coronarica acuta (ACS): l'erosione della placca. A differenza della rottura, le placche erose presentano un cappuccio fibroso integro, alta concentrazione di matrice extracellulare (ECM), in particolare acido ialuronico, ed un importante stato infiammatorio. Sono ricche in VSMC e povere in lipidi e macrofagi, con il trombo risultante di tipo "bianco", a prevalenza piastrinica, differente rispetto al "trombo rosso" fibrino-eritrocitario della rottura<sup>23</sup>.

L'erosione rappresenta circa un terzo delle ACS, con predominanza nei casi di NSTEMI, soprattutto in giovani, donne e pazienti senza i classici fattori di rischio cardiovascolare. È una condizione che si sviluppa più frequentemente a livello dell'arteria discendente anteriore sinistra e si associa a trombi meno occlusivi, con possibilità di distacco ed embolizzazione distale<sup>23</sup>.

Così come per la rottura della placca, anche nell'erosione concorrono diversi fattori cellulari che ne contribuiscono le insorgenze: questo processo ha origine a livello della membrana basale endoteliale, costituita principalmente da collagene di tipo IV e laminina. La degradazione di questi componenti, in particolare del collagene IV, ad opera della metalloproteinasi-2 (MMP-2), compromette l'integrità dell'endotelio e favorisce la desquamazione cellulare. L'attivazione di MMP-2 avviene attraverso la metalloproteinasi di membrana MMP-14, la cui espressione è indotta da citochine proinfiammatorie come IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Questo pathway MMP-14/MMP-2 è differente da quello coinvolto nella rottura di placca, dove prevalgono MMP-1, -8 e -13, più efficaci nella degradazione del collagene fibrillare del cappuccio fibroso<sup>23</sup>.

La morte delle cellule endoteliali (EC), prevalentemente per apoptosi, rappresenta un secondo meccanismo essenziale nello sviluppo dell'erosione. Fondamentale è l'acido ipocloroso (HOCl), un potente ossidante prodotto dall'enzima mieloperossidasi (MPO), rilasciato dai neutrofili attivati. L'HOCl induce danno ossidativo diretto alle membrane cellulari e al DNA delle EC, portando a perdita di integrità e apoptosi. L'integrità endoteliale è ulteriormente minacciata dalle turbolenze emodinamiche del flusso, che compromettono la funzione delle EC e ne aumentano la vulnerabilità<sup>23</sup>.

Un altro ruolo cardine è rivestito dal recettore Toll-like 2 (TLR2), glicoproteina recettoriale della famiglia *pattern recognition receptor* (PRR) appartenente all'immunità innata. Nei pazienti con erosione, TLR2 risulta sovraespresso sia a livello delle EC sia in circolo. L'attivazione di TLR2 da parte di ligandi endogeni promuove un fenotipo proinfiammatorio e proadesivo nelle EC, oltre a sfavorire la ricostituzione endoteliale post desquamazione. Questo ambiente proinfiammatorio favorisce la formazione delle *neutrophil extracellular traps* (NETs), strutture extracellulari rilasciate da neutrofilii attivati attraverso un processo definito NETosi, che comporta l'espulsione di DNA cromatinico associato a MPO, proteasi e mediatori infiammatori come l'IL-1 $\alpha$ . Questo processo aumenta notevolmente lo stress ossidativo ed amplifica la morte cellulare<sup>23</sup>.

### ***1.4.3 Cause non aterosclerotiche***

Oltre ai meccanismi aterosclerotici descritti fin'ora, esistono diverse cause non aterosclerotiche che possono portare ad ischemia miocardica acuta e sindrome coronarica acuta. Le più rilevanti includono il vasospasmo coronarico, la dissezione coronarica spontanea (SCAD), il *myocardial bridging* (MB), la cardiomiopatia da stress (sindrome di Takotsubo) e l'embolia coronarica<sup>23</sup>.

#### *Vasospasmo coronarico*

È una condizione caratterizzata da un restringimento temporaneo delle arterie coronarie epicardiche, responsabile di episodi di ischemia miocardica e potenzialmente di infarto miocardico di tipo 2. Tale fenomeno si osserva con maggiore frequenza negli uomini di età compresa tra i 40 e i 70 anni, con una prevalenza più elevata nella popolazione giapponese. Le cause sono molteplici e comprendono alterazioni della funzione endoteliale, disfunzioni del sistema nervoso autonomo, aumento dello stress ossidativo e fattori genetici predisponenti. La diagnosi si avvale in modo affidabile del test all'ergonovina eseguito durante l'angiografia coronarica, mentre il trattamento si basa sull'impiego di nitrati e calcio-antagonisti<sup>23</sup>.

*Dissezione coronarica spontanea (SCAD)*

Patologia rara ma rilevante soprattutto nelle donne giovani prive di fattori di rischio aterosclerotici. È caratterizzata dalla formazione di un falso lume all'interno della parete coronarica, con conseguente sviluppo di un ematoma intramurale che ostacola il flusso ematico per compressione del lume vascolare. La diagnosi si basa inizialmente sulla coronarografia, associata all'imaging intracoronarico con tomografia a coerenza ottica (OCT) nei casi in cui la diagnosi è incerta. La gestione terapeutica è nella maggior parte dei casi conservativa, mediante l'impiego di  $\beta$ -bloccanti, antianginosi e terapia antitrombotica<sup>23</sup>.

*Ponte miocardico*

Anomalia congenita in cui un tratto dell'arteria coronaria decorre all'interno del miocardio, più di frequente a livello dell'arteria discendente anteriore. La diagnosi avviene tramite tomografia computerizzata coronarica, che consente di visualizzare il decorso intramiocardico dell'arteria. La gestione terapeutica include l'impiego di  $\beta$ -bloccanti o calcio-antagonisti; nei soggetti resistenti alla terapia farmacologica può essere valutata l'opzione chirurgica<sup>23</sup>.

*Cardiomiopatia da stress (sindrome di Takotsubo)*

Condizione transitoria e reversibile che insorge tipicamente in seguito a eventi stressanti, con alterazioni della contrattilità ventricolare sinistra che simulano un infarto miocardico. Colpisce prevalentemente donne in postmenopausa. Sembrerebbe dovuta principalmente alla stimolazione simpatica con conseguente aumento dei livelli di catecolamine circolanti e tissutali cardiache. Le catecolamine possono indurre spasmi vascolari o tossicità diretta a livello miocardico, provocando uno squilibrio tra domanda e offerta di ossigeno e, nei casi più gravi, uno shock post-ischemico. Il trattamento si basa sull'eliminazione dei fattori predisponenti, sulla gestione dello stress e su interventi di supporto sintomatico<sup>24</sup>.

*Embolia coronarica*

È un evento patologico caratterizzato dall'ostruzione delle arterie coronarie da parte di emboli originati in sedi extracoronariche, come il cuore, il sistema venoso o da materiali esogeni introdotti accidentalmente. La condizione può essere distinta in tre forme principali:

- Diretta, con origine da strutture del cuore sinistro;
- Paradossa, dovuta al passaggio di trombi venosi nel circolo arterioso coronarico;
- Iatrogena, conseguente a manovre invasive, come le procedure interventistiche.

La diagnosi si fonda su un'attenta anamnesi, sull'imaging coronarico e sull'identificazione della possibile fonte emboligena. L'approccio terapeutico dipende dalla causa sottostante e può comprendere tecniche di rimozione del trombo, angioplastica e terapia anticoagulante<sup>23</sup>.

## ***1.5 Recettore per le Lipoproteine a bassa densità***

Il recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDLR) è una glicoproteina transmembrana identificata la prima volta nel 1974, che permette alle cellule di rimuovere dalla circolazione il colesterolo legato all'apolipoproteina B-100 (Apo B-100), presente sulle particelle LDL.

La sintesi (Fig.12) inizia nel nucleo, dove il gene per *LDLR*, situato sul cromosoma 19p13.2, viene trascritto in un mRNA maturo della lunghezza di circa 5,3 kilobasi. L'espressione del gene è regolata principalmente dal fattore trascrizionale SREBP2, la cui attivazione dipende dai livelli intracellulari di colesterolo. In condizioni di deplezione del colesterolo, il complesso formato da SREBP2, SCAP (SREBP Cleavage-Activating Protein) e INSIG1/2 (Insulin-Induced Genes 1 e 2) subisce un riarrangiamento conformazionale dovuto al distacco di INSIG1/2. Questo consente al complesso SREBP2–SCAP di migrare dal reticolo endoplasmatico al Golgi tramite vescicole COPII<sup>25</sup>.

Il complesso viene quindi trasportato verso il complesso del Golgi tramite vescicole COPII. Nel Golgi la proteina SREBP subisce un primo taglio proteolitico ad opera della Site-1 Proteasi (S1P), un evento che richiede la presenza del cofattore SPRING (SREBP cleavage-activating protein-regulated protease inhibitor gene product) per la corretta attivazione del processo proteolitico. Successivamente, la porzione residua della proteina viene ulteriormente processata dalla Site-2 Proteasi (S2P), un enzima metalloproteasico che catalizza il secondo taglio all'interno del dominio transmembrana. Questo evento libera il dominio N-terminale a struttura *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH), che rappresenta la forma attiva della proteina SREBP dal punto di vista trascrizionale<sup>25</sup>.

Il dominio bHLH, una volta rilasciato nel citoplasma, migra nel nucleo dove si lega a specifiche sequenze di DNA note come *sterol regulatory elements* (SRE), localizzate nei promotori di geni target implicati nell'omeostasi lipidica. Tra questi, uno dei principali è il gene codificante per il recettore delle LDL, la cui trascrizione viene indotta in risposta al legame del fattore di trascrizione SREBP alla regione promotrice<sup>25</sup>.

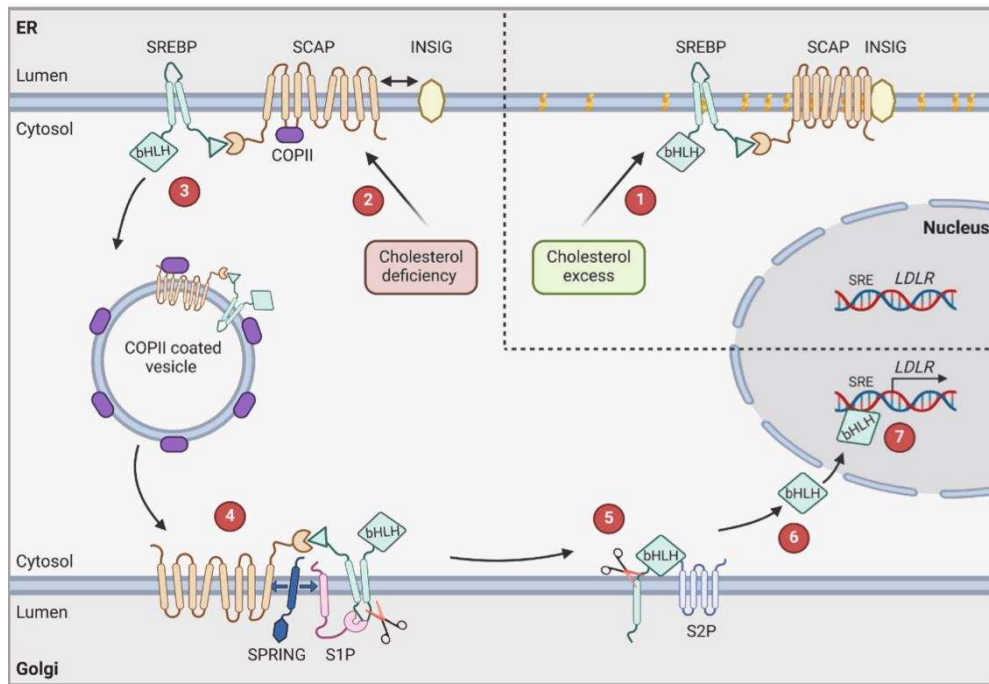


Fig. 12 – Regolazione di LDLR mediata da SREBP<sup>25</sup>.

Il peptide nascente, detto prepro-LDLR, presenta un peptide segnale N-terminale che ne guida l'ingresso nel lume del RE. In questa fase iniziale, il recettore ha un peso molecolare di circa 90 kDa. All'interno del RE avviene la rimozione del peptide segnale, convertendo la proteina nella forma denominata pro-LDLR. Seguono una serie di modificazioni post-traduzionali fondamentali per la funzionalità del recettore: circa 14 residui di asparagina sono modificati tramite N-glicosilazione, vengono formati numerosi ponti disolfuro nei domini ricchi in cisteina (domini LA) ed il corretto ripiegamento viene facilitato da chaperoni molecolari. Tra questi, un ruolo chiave è svolto dal *receptor-associated protein* (RAP), che si lega ai domini di tipo A del LDLR. Alla fine di questa fase, il pro-LDLR ha un peso molecolare compreso tra 130 e 135 kDa<sup>26</sup>.

Pro-LDLR viene trasportato nel complesso del Golgi, dove subisce ulteriori modificazioni, tra cui l'aggiunta di catene zuccherine tramite O-glicosilazione e la maturazione delle catene N-glicosidiche già presenti. Queste modificazioni contribuiscono ad aumentare la stabilità del recettore, la sua affinità per il ligando (apolipoproteina B100) e la resistenza alla degradazione proteolitica. La forma completamente matura del recettore ha un peso molecolare di circa 140 kDa<sup>27</sup>.

Una volta completata la maturazione, il recettore viene inserito in vescicole di trasporto post-Golgi e veicolato verso la membrana plasmatica, dove viene esposto sulla superficie

cellulare. Qui è in grado di riconoscere e legare le particelle LDL circolanti, permettendone l'endocitosi tramite invaginazione mediata da clatrina<sup>27</sup>.

### 1.5.1 Struttura recettoriale

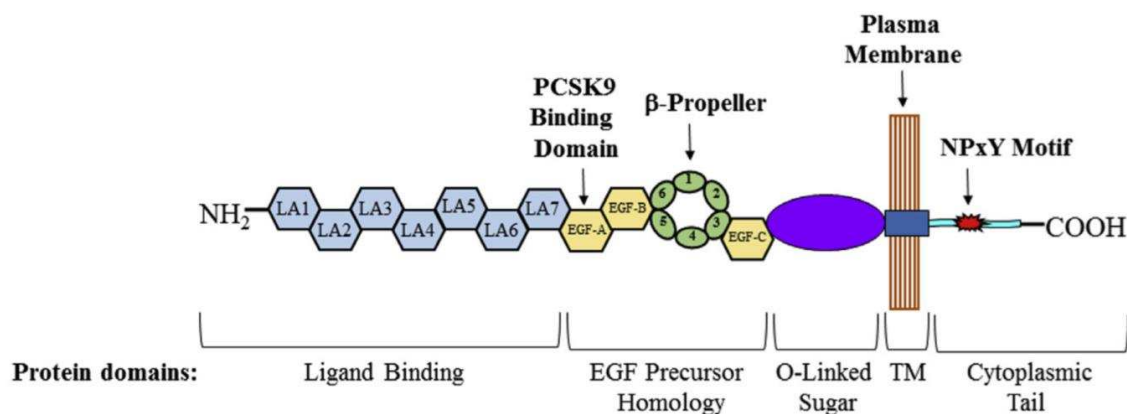


Fig. 13 – Architettura funzionale del recettore per le LDL, focus sui cinque domini.

Il recettore LDL maturo (Fig. 13) è formato da 839 amminoacidi e presenta cinque domini funzionali:

- I. Dominio di legame con il ligando, situato all'estremità extracellulare N-terminale, formato da 7 ripetizioni di circa 40 amminoacidi, contenenti residui acidi che legano il calcio, necessari per l'interazione con Apo B-100.
- II. Dominio simile all'EGF (Epidermal Growth Factor), che include tre sequenze simili a EGF e una regione YWTD che si ripiega a formare un  $\beta$ -propeller, utile per il rilascio delle LDL a pH acido.
- III. Dominio di O-glicosilazione, ricco in serine e treonine, non coinvolto direttamente nel legame con il ligando, ma importante per proteggere il recettore dalla degradazione.
- IV. Dominio transmembrana, composto da 22 amminoacidi idrofobici che ancorano la proteina alla membrana cellulare. Mutazioni in questa regione possono ridurre la stabilità dell'ancoraggio e causare il rilascio del recettore nel plasma.
- V. Dominio citoplasmatico, all'estremità C-terminale, composto da 50 amminoacidi essenziali per l'endocitosi clatrina-mediata e per il riciclo del recettore.

### ***1.5.2 Internalizzazione e riciclo del recettore LDL***

Il legame tra il recettore delle LDL e le LDL è mediato principalmente dall'interazione con l'apolipoproteina B-100 (ApoB-100) (Fig. 14), il principale costituente proteico delle LDL. In condizioni fisiologiche, il dominio extracellulare del recettore assume una conformazione aperta, che espone il sito di legame per il ligando e consente l'interazione ad alta affinità con ApoB-100<sup>28</sup>.

Una volta formato il complesso LDL-LDLR sulla superficie delle cellule epatiche, l'endocitosi è avviata tramite la mediazione della clatrina. Questo processo dipende da una sequenza segnale specifica (FDNPVY) localizzata nella coda citoplasmatica del recettore, essenziale per il reclutamento dell'adattatore LDLRAP1 e per l'inizio dell'invaginazione della membrana. L'intero complesso viene così internalizzato in vescicole rivestite di clatrina, che successivamente perdono il rivestimento e si fondono con gli endosomi precoci<sup>29</sup>.

All'interno degli endosomi (Fig. 14), l'ambiente acidico (pH ~5) induce una modificazione conformazionale del recettore, promuovendo il distacco della lipoproteina. A questo punto, le LDL sono indirizzate ai lisosomi, dove vengono degradate dagli enzimi idrolitici in colesterolo libero, acidi grassi e amminoacidi. Il colesterolo liberato può essere utilizzato dalla cellula per la sintesi di membrane, ormoni steroidei o essere immagazzinato sotto forma di esteri, a seconda dello stato metabolico<sup>29</sup>.

Il recettore LDL, dopo il rilascio del suo ligando, viene riciclato ed indirizzato verso la membrana plasmatica tramite vescicole di riciclo, potendo così partecipare a numerosi cicli di captazione. Si stima che ogni recettore possa completare circa 100–150 cicli durante la sua vita funzionale, con un tempo medio di riciclo che varia tra i 10 e i 20 minuti<sup>30</sup>.

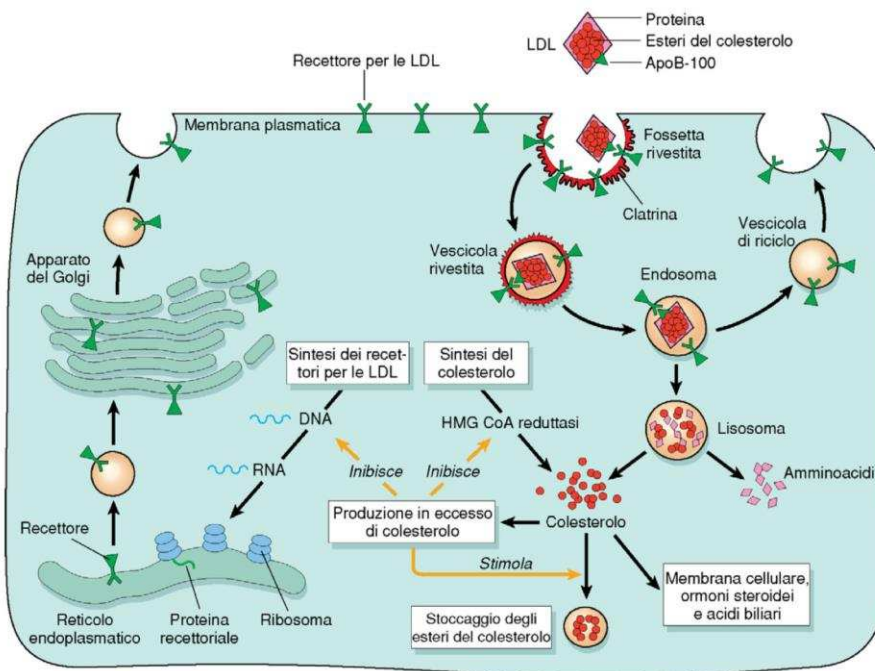


Fig. 14 – Ciclo del recettore LDL e regolazione intracellulare del colesterolo<sup>8</sup>.

### 1.5.3 Regolazione recettoriale

La regolazione di LDLR può avvenire a livello trascrizionale, post-trascrizionale e post-traduzionale, rispondendo in maniera dinamica ai livelli intracellulari di colesterolo.

#### Regolazione trascrizionale

Come precedentemente discusso, le proteine della famiglia SREBP, in particolare SREBP-2, rivestono un ruolo centrale nella regolazione dell'omeostasi del colesterolo, promuovendo in condizioni di deplezione intracellulare, l'attivazione del pathway trascrizionale che induce l'espressione del gene LDLR.

Al contrario, quando i livelli di colesterolo sono elevati, il complesso SCAP/SREBP-2 resta ancorato alla membrana del reticolo endoplasmatico, impedendo la maturazione di SREBP-2 e, di conseguenza, inibendo la trascrizione del recettore<sup>31</sup>.

#### Controllo post-trascrizionale

La regolazione post-trascrizionale è possibile tramite l'azione dei microRNA, piccole molecole di RNA non codificante lunghe circa 19–22 nucleotidi. Questi regolatori agiscono legandosi a specifiche sequenze target nei 3'UTR (3'-Untranslated Region) degli mRNA, modulandone la stabilità o la traduzione. In particolare, hsa-miR-140-5p è stato identificato come un regolatore diretto di LDLR, in grado di ridurne l'espressione e conseguentemente, la capacità di uptake delle LDL circolanti. Altri miRNA, come miR-182, miR-96 e miR-183, regolano i livelli di SREBP, mentre miR-33 regola l'efflusso di colesterolo regolando ABCA1 (ATP-binding cassette transporter 1)<sup>31</sup>.

### *Regolazione post-traduzionale*

A livello post-traduzionale, l'espressione funzionale del recettore LDLR può essere modulata dall'azione della proteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 (PCSK9). Questa proteina, secreta prevalentemente dagli epatociti, si lega alla porzione extracellulare di LDLR presente sulla superficie cellulare. Il complesso LDLR-PCSK9 viene successivamente internalizzato ed indirizzato verso la degradazione lisosomiale, impedendo il riciclo del recettore alla membrana plasmatica. Ciò determina una riduzione del numero di recettori funzionali disponibili per la captazione delle LDL. L'espressione di PCSK9 è anch'essa regolata positivamente da SREBP-2, costituendo un sistema volto ad evitare un eccessivo accumulo intracellulare di colesterolo<sup>31</sup>.

## 1.6 Proproteina convertasi subtilisina/Kexina di tipo 9

All'inizio del 2003, presso l'*Institut de recherches cliniques de Montréal*, il gruppo di ricerca guidato da Nabil Seidah, insieme al collega Jae Byun, identificò una nuova convertasi appartenente alla famiglia delle proproteine, localizzandone il gene sul braccio corto del cromosoma 1. Contemporaneamente, in Francia, il gruppo della genetista Catherine Boileau presso l'*Hôpital Necker-Enfants Malades* stava indagando alcune famiglie colpite da ipercolesterolemia familiare. Pur avendo individuato una mutazione ricorrente sullo stesso cromosoma 1, il gene responsabile rimaneva ancora sconosciuto.

Quando le due linee di ricerca si incrociarono, divenne possibile correlare le mutazioni genetiche osservate con un nuovo attore molecolare: la proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 (PCSK9) (Fig.15). I risultati congiunti vennero pubblicati nello stesso anno, aprendo a una nuova comprensione del ruolo di questa proteina nel metabolismo del colesterolo. Da analisi successive fu sempre più evidente come, mutazioni che conferivano un guadagno di funzione, causavano una riduzione eccessiva del numero di recettori per le LDL a livello epatico, e quindi un innalzamento dei livelli plasmatici di colesterolo LDL. Furono questi i primi studi sulla molecola, che culminarono con l'immissione in commercio di farmaci ipolipidizzanti, due anticorpi monoclonali (Ab) ed uno small interfering RNA (siRNA).

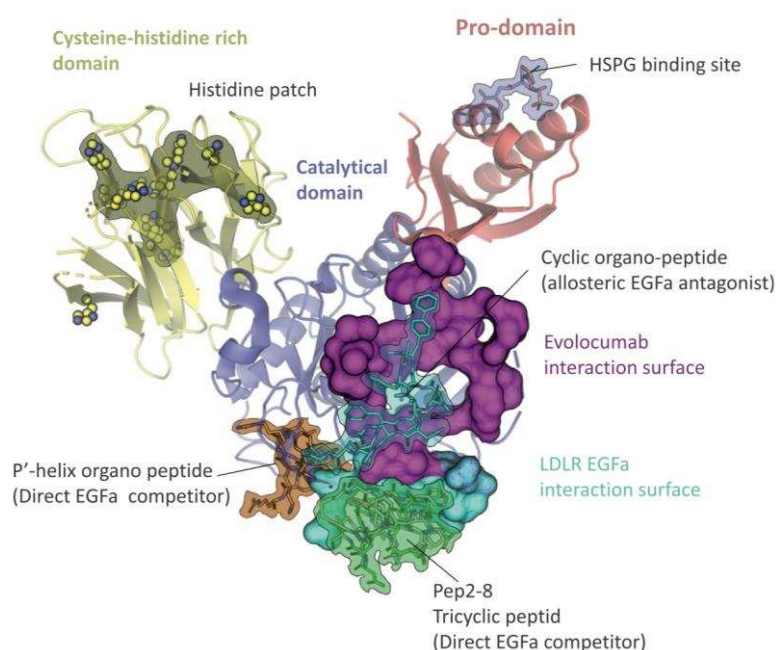


Fig. 15 – Struttura cristallina della PCSK9 (PDBid: 2PMW). Sono evidenziati i domini della PCSK9 e le regioni importanti per lo sviluppo degli inibitori della PCSK9<sup>32</sup>.

Le proproteine convertasi di tipo subtilisina/kexina (abbreviate in PCSK) sono una famiglia di serina proteasi coinvolte nella maturazione post-traduzionale di numerose proteine biologicamente attive. Devono il loro nome alla combinazione di due enzimi: subtilisina, una serina proteasi di origine batterica, e kexina, una proteasi presente nei lieviti. Entrambi questi enzimi condividono caratteristiche strutturali e funzionali con le PCSK e rappresentano gli archetipi da cui è derivata l'attuale famiglia.

Nel genoma umano sono presenti nove membri principali della famiglia PCSK (Fig. 16), denominati PCSK1 (anche noto come PC1/3), PCSK2 (PC2), FURIN (PCSK3), PCSK4, PCSK5, PCSK6 (PACE4), PCSK7, PCSK8 (alias SKI-1 o S1P), e PCSK9. Tutti tranne SKI-1/S1P e PCSK9 appartengono al sottogruppo "classico", caratterizzato dalla presenza di un dominio catalitico omologo alla subtilisina e di un dominio regolatorio che guida l'attivazione enzimatica<sup>33</sup>.

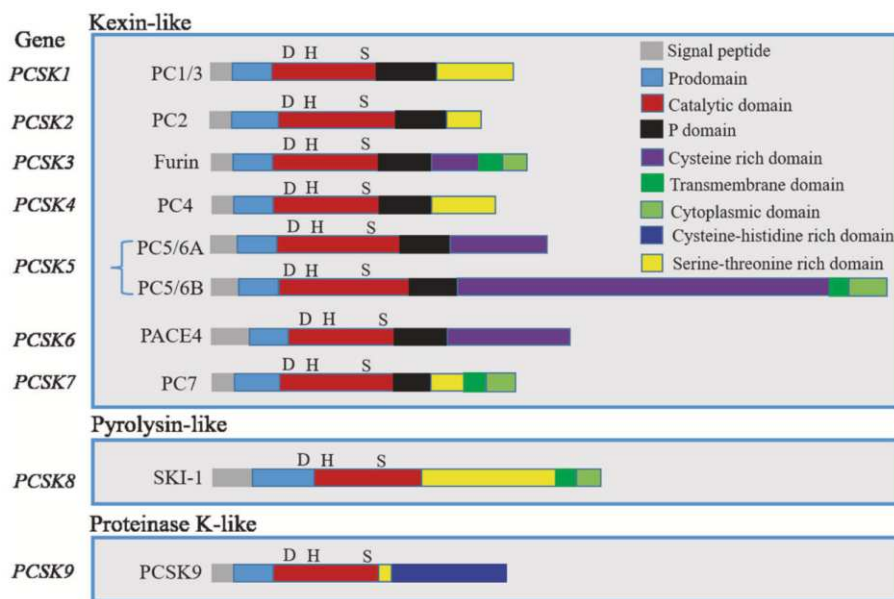


Fig. 16 - Illustrazione schematica del modello strutturale delle proproteina convertasi<sup>33</sup>.

Le PCSK agiscono nel compartimento secretorio della cellula, come il reticolo endoplasmatico e l'apparato di Golgi, oppure alla superficie cellulare, a seconda del tipo e della funzione del singolo enzima. Una volta attivate, riconoscono specifiche sequenze amminoacidiche nelle proproteine bersaglio e le tagliano in punti precisi, convertendole nella loro forma funzionalmente attiva<sup>33</sup>.

### 1.6.1 Struttura e funzioni

Il gene umano *PCSK9* è localizzato sul cromosoma 1. Questo gene è lungo circa 22-kb e comprende 12 esoni che codificano per una glicoproteina di 692 amminoacidi. Sezionando la struttura amminoacidica (Fig.17) si possono notare diversi domani funzionali:

- Peptide segnale (SP; amminoacidi 1-30 codificati dall'esone 1)<sup>33</sup>;
- Prodominio inibitorio (amminoacidi 31-152 codificati dagli esoni 1 e 3)<sup>33</sup>;
- Dominio catalitico simile alla subtilisina (amminoacidi 153-404 codificati dagli esoni 3 e 8)<sup>33</sup>;
- Regione cerniera (HR; amminoacidi 405-454 codificati dagli esoni 8 e 10)<sup>33</sup>;
- Dominio C-terminale ricco di cisteina e istidina (CHRD; amminoacidi 455-692 codificati dagli esoni 10 e 12)<sup>34</sup>.

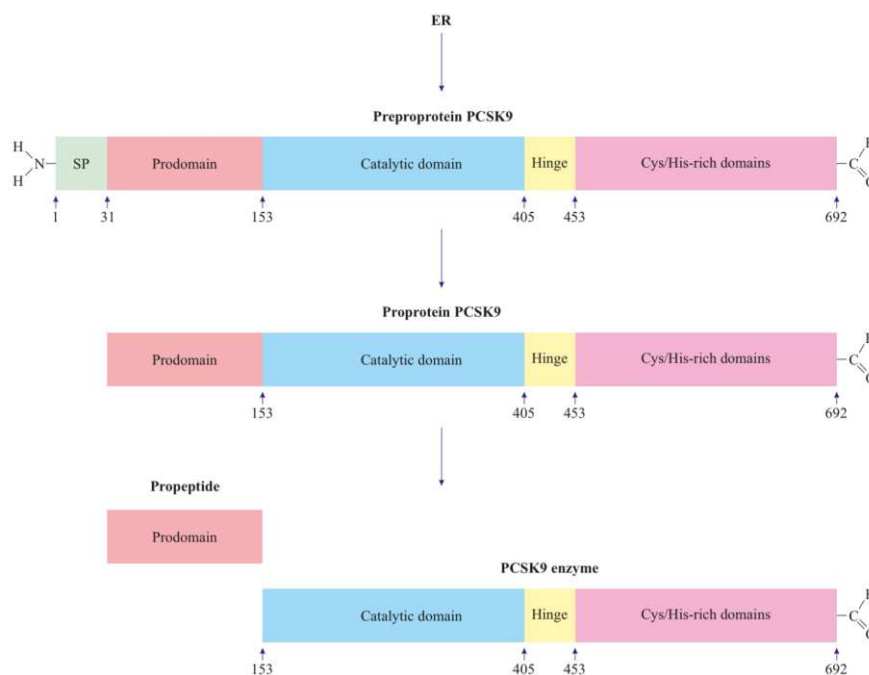


Fig. 17 - Struttura biologica primaria e processo di elaborazione della PCSK9. Il reticolo endoplasmatico rilascia la preproteina PCSK9 immatura che contiene un peptide segnale (SP). Le successive fasi di scissione sequenziale producono la propeptina che viene infine scissa in propeptide ed enzima PCSK9 maturo<sup>33</sup>.

Viene inizialmente sintetizzata come uno zimogeno solubile di circa 74 kDa, che subisce un processo di autocatalisi nel reticolo endoplasmatico (RE). Questo processo determina la rimozione di un propeptide di 14 kDa dalla regione N-terminale, originando una forma matura della proteina di circa 63 kDa, e permettendone l'uscita dal RE. Il propeptide funge da blocco molecolare, interagisce in maniera non covalente col sito catalitico di PCSK9,

impedendo l'accesso di altri substrati o potenziali inibitori. Il complesso PCSK9-prodominio, una volta assemblato, viene trasportato attraverso la via secretoria fino alla circolazione sistemica, dove potrà svolgere la propria funzione. Il sito responsabile del taglio autocatalitico è stato localizzato nella sequenza SVFAQY152, in cui la glutammina (Q) rappresenta il residuo in posizione P1, punto esatto del taglio proteolitico<sup>33</sup>.

In circolo, PCSK9 si presenta prevalentemente in forma monomerica, ma può anche formare omodimeri o omotrimeri. Queste forme multimeriche sono state associate a una maggiore efficienza nella degradazione del recettore per le LDL, mentre le HDL sembrano esercitare un effetto inibitorio su tale aggregazione. Le modificazioni post-traduzionali di PCSK9 rivestono un ruolo fondamentale nella sua attività biologica: tra queste, la glicosilazione nel residuo asparagina533, la solfatazione della tirosina38 e la fosforilazione nei residui serina47 e serina688, di cui quest'ultima svolge un ruolo particolarmente rilevante proteggendo il propeptide dalla degradazione proteolitica<sup>33</sup>.

### ***1.6.2 Pathway molecolare***

PCSK9 è espressa e secreta da diversi tessuti, ma principalmente da fegato, intestino tenue, cervello, reni e nei siti delle placche aterosclerotiche. I livelli normali di PCSK9 nel plasma umano variano da 30 ng/mL a 4 mg/mL. E' possibile riscontrare il PCSK9 anche nel fluido cerebrospinale, i cui livelli risultano aumentati in caso di disordini neurodegenerativi<sup>35</sup>.

Il PCSK9 plasmatico controlla i livelli di LDL plasmatiche (Fig.18) principalmente influenzando i livelli di espressione del recettore LDL sulla superficie delle cellule epatiche. Una volta secreto, PCSK9 interagisce tramite la porzione C-terminale con il dominio del fattore di crescita epidermico-A (EGF-A) del recettore delle LDL cellulare a pH neutro, con stechiometria 1:1. Il complesso PCSK9/recettore LDL entra quindi nella via endosomiale, dove il pH acido dell'ambiente aumenta di 150-170 volte l'affinità tra le due entità ( $K_d = 1-8$  nM) rispetto all'affinità di questa convertasi a pH neutro permettendo l'instaurarsi di ponti salini con le catene laterali del recettore bloccandolo in conformazione aperta, impedendogli il normale riciclo, ed indirizzando il recettore LDL verso la degradazione irreversibile. Una volta nel lisosoma, un segnale che innesca la degradazione del recettore LDL potrebbe essere l'autoassociazione di PCSK9. In questo meccanismo di

indirizzamento svolge un ruolo fondamentale il dominio C-terminale di PCSK9, come dimostra la perdita della capacità degradativa nel caso in cui nella proprotein convertasi venisse a mancare questa porzione<sup>36</sup>.

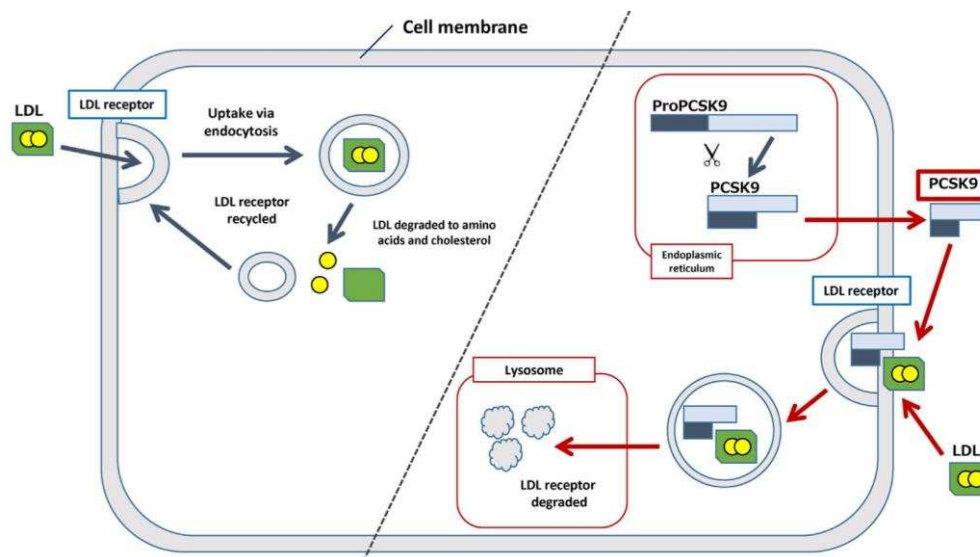


Fig. 18 - Pathway di LDLR e degradazione dello stesso ad opera di PCSK9<sup>37</sup>.

### 1.6.3 Regolazione genica di PCSK9

La regolazione trascrizionale del gene PCSK9 è controllata da diversi elementi chiave, tra cui spiccano gli SRE (Fig.19) altamente conservati nella regione promotrice prossimale. Questo rende l'espressione del gene strettamente dipendente dai livelli intracellulari di steroli. Entrambe le isoforme della proteina legante SRE, SREBP-1 e SREBP-2, sono in grado di attivare la trascrizione di PCSK9 tramite le SRE, anche se evidenze sperimentali indicano che SREBP-2 rappresenta il regolatore principale della risposta sterolo-dipendente *in vivo*<sup>38</sup>. Come visto nel paragrafo incentrato sul recettore LDL, i motivi SRE sono presenti anche a livello del promotore di *LDLR*. Di conseguenza, la riduzione dei livelli intracellulari di colesterolo determina un'attivazione coordinata della trascrizione di *LDLR* e *PCSK9* attraverso la via mediata da SREBP<sup>39</sup>.

Numerosi studi hanno evidenziato che le donne in postmenopausa presentano livelli di PCSK9 significativamente più elevati rispetto alle donne in premenopausa. Questa

variazione è attribuibile alla riduzione dei livelli di estradiolo che si verifica fisiologicamente con la cessazione dell'attività ovarica<sup>40</sup>.

Al contrario, negli uomini non si osservano variazioni significative nei livelli di PCSK9 in relazione al testosterone, e la terapia sostitutiva con androgeni non sembra modificarne la concentrazione plasmatica<sup>40</sup>.

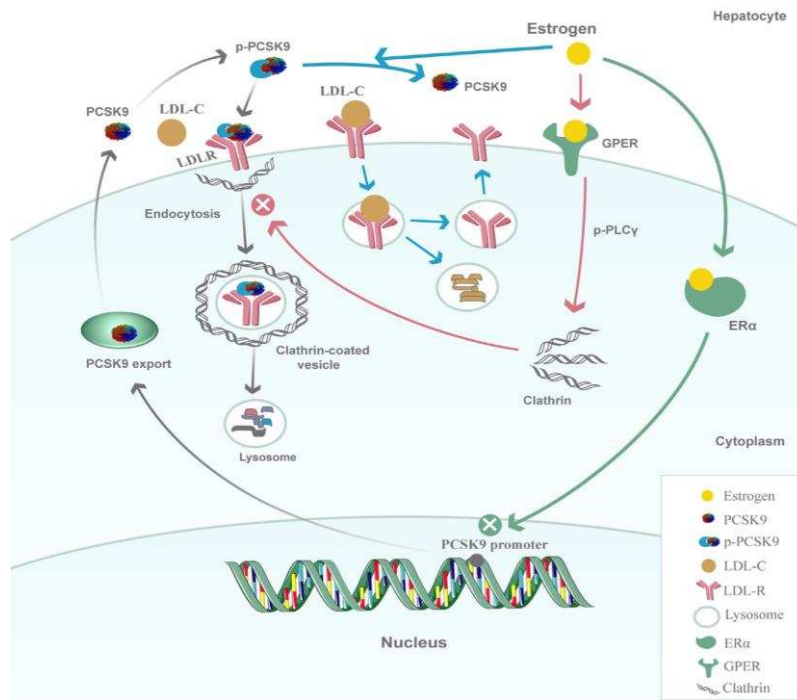


Fig. 19 - Meccanismi molecolari della regolazione estrogenica di PCSK9 negli epatociti<sup>40</sup>.

A livello molecolare, l'estradiolo agisce sulla regolazione trascrizionale del gene PCSK9 attraverso il recettore nucleare ERα (*estrogeno recettore α*). In particolare, è stato osservato che l'attivazione di ERα da parte di estradiolo o fitoestrogeni è in grado di sopprimere l'attività del promotore prossimale del gene PCSK9 in epatociti umani, riducendo così la sintesi della proteina. Oltre al recettore nucleare, un ruolo significativo è svolto dal recettore estrogenico di membrana GPER (*G-protein estrogeno recettore*), il quale, inducendo la fosforilazione di PLC-γ (phospholipasi C-γ), altera la distribuzione della clatrina, che interferisce con l'endocitosi del complesso PCSK9-LDLR a livello epatico, limitando la capacità di PCSK9 di indirizzare i recettori LDL verso la degradazione lisosomiale<sup>40</sup>.

Inoltre, è stato dimostrato che il trattamento con estradiolo riduce la fosforilazione della forma secreta della proteina, compromettendone la capacità di legarsi in modo stabile al recettore LDL e di promuoverne la degradazione. Questo effetto si traduce in una maggiore

stabilità dei recettori LDL sulla membrana degli epatociti, con un conseguente aumento della loro densità e una più efficace rimozione del LDL-C dal circolo ematico<sup>40</sup>.

## ***1.7 Terapie ipolipidemizzanti***

### ***1.7.1 Statine***

Le Statine costituiscono una delle classi farmacologiche più rilevanti nella prevenzione e nel trattamento delle malattie cardiovascolari aterosclerotiche. La loro azione si basa sull'inibizione competitiva dell'enzima 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA reduttasi (HMG-CoA reduttasi), fondamentale per la biosintesi del colesterolo endogeno. Tale inibizione determina la riduzione della sintesi epatica di colesterolo e, di conseguenza, l'aumento dell'espressione dei recettori epatici per le lipoproteine a bassa densità, incrementando la rimozione del colesterolo LDL dal circolo ematico.

Lo sviluppo delle Statine ebbe origine negli anni Settanta, grazie al lavoro pionieristico del biochimico giapponese Akira Endo <sup>41</sup>, che identificò nella Mevastatina, isolata dal fungo *Penicillium citrinum*, il primo inibitore naturale della HMG-CoA reduttasi. Successivamente, la Lovastatina, ottenuta da *Aspergillus terreus*, venne sviluppata da Merck & Co. ed approvata dalla *Food and Drug Administration* nel 1987 come primo farmaco della classe ad essere introdotto in terapia<sup>42</sup>.

La Lovastatina però, presentava due principali limitazioni: l'assenza di copertura brevettuale nei paesi occidentali ed una potenza inibitoria non ottimale, che ne pregiudicarono l'impiego nei grandi trial clinici di prevenzione cardiovascolare<sup>43</sup>.

Le nuove scoperte nell'ambito dei meccanismi molecolari delle Statine permisero di ottimizzarne la struttura chimica e migliorarne l'efficacia farmacologica. Si dimostrò che l'attività inibitoria delle Statine dipendeva dalla loro affinità per il sito catalitico dell'HMG-CoA reduttasi. In condizioni fisiologiche, l'enzima lega inizialmente il substrato HMG-CoA, seguito dal cofattore NADPH, formando un complesso ternario attivo.<sup>43</sup>

Furono quindi sviluppate ed immesse in commercio le prime molecole che mostravano un'affinità superiore per il sito enzimatico rispetto al substrato naturale. La chiave di svolta fu l'identificazione di una porzione strutturale, il  $\beta$ -metilbutirrato, che mimava la struttura dell'HMG-CoA e risultò fondamentale per l'attività inibitoria. La rimozione di tale porzione, infatti, comportava una riduzione dell'efficacia. Il potenziamento dell'attività si ottenne anche mediante modificazioni del nucleo decalinico, in particolare con l'introduzione di gruppi metilici, che portarono allo sviluppo della Simvastatina, un

derivato semisintetico della Lovastatina. La Simvastatina, grazie ad un gruppo metilico in posizione 2', presentava una maggiore lipofilia e una potenza inibitoria superiore<sup>43</sup>.

Un ulteriore passo avanti si ottenne con la Pravastatina, caratterizzata da una struttura ad anello aperto, che ne consente l'attivazione diretta senza necessità di conversione metabolica<sup>43</sup>.

Molti furono gli studi clinici che confermarono la loro efficacia. Lo *Scandinavian Simvastatin Survival Study* (4S), pubblicato nel 1994, fu il primo a dimostrare una significativa riduzione della mortalità totale in pazienti con coronaropatia trattati con Simvastatina. A questo seguirono altri studi, tra cui il *West of Scotland Coronary Prevention Study* (WOSCOPS) e l'*Heart Protection Study* (HPS), che ne consolidarono l'efficacia anche in prevenzione primaria ed in popolazioni ad alto rischio cardiovascolare<sup>44</sup>.

Attualmente, le Statine rappresentano il trattamento di prima linea per la gestione dell'ipercolesterolemia e la riduzione del rischio cardiovascolare globale. Le molecole oggi disponibili includono sia Statine di origine naturale sia composti di sintesi, e si differenziano per potenza, caratteristiche farmacocinetiche e profilo di tollerabilità.

### **1.7.1.1 Struttura chimica e classificazione**

Dal punto di vista strutturale tutte le Statine condividono la porzione comune 3,5-diidrossieptanoica, analoga al substrato HMG-CoA, essenziale per l'attività inibitoria sull'enzima bersaglio. Questo gruppo funzionale deve necessariamente presentare una stereochimica 3R,5R, affinché sia riconosciuto efficacemente dall'enzima bersaglio<sup>45</sup>.

Possono quindi essere suddivise in due categorie (Fig.20) in base alla natura del nucleo aromatico presente nella molecola:

- Statine di tipo I (naturali e semisintetiche): Lovastatina, Compactina, Simvastatina e Pravastatina<sup>45</sup>;

- Statine di tipo II (sintetiche): Atorvastatina, Cerivastatina, Rosuvastatina, Fluvastatina e Pitavastatina<sup>45</sup>.

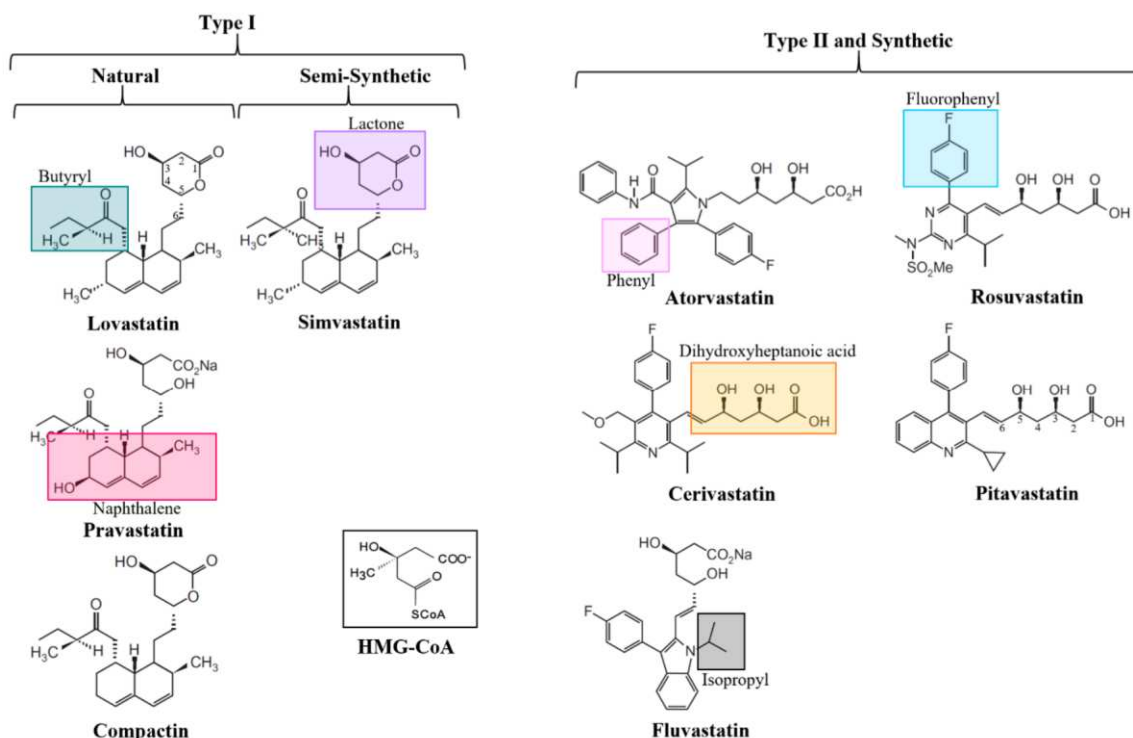


Fig. 20 – Struttura chimica e classificazione delle Statine presenti in commercio<sup>45</sup>.

Le Statine di tipo I sono caratterizzate da un nucleo decalinico, derivato dalla struttura della Mevastatina, che è il primo composto scoperto in questa classe. Nella Pravastatina, il nucleo decalinico è stato modificato con l'aggiunta di un sostituito ossidrilico, trasformandolo in un naftalene, aumentando la solubilità in acqua e migliorandone la biodisponibilità rispetto alle altre Statine naturali. Quest'ultime, dal canto loro, sono profarmaci lattone inattivi che richiedono un'attivazione epatica tramite idrolisi del lattone per diventare acidi idrossiattivi<sup>45</sup>.

La Pravastatina e le Statine sintetiche possiedono già un gruppo 3,5-idrossiacido, che imita la struttura dell'HMG-CoA, permettendo loro di legarsi direttamente all'enzima HMG-CoA reduttasi senza necessità di attivazione metabolica<sup>45</sup>.

Il gruppo butirile, presente nelle Statine naturali, viene modificato nella Simvastatina tramite l'aggiunta di un gruppo metilico, modifica che la classifica come statina semisintetica. Tale modificazione aumenta la stabilità della molecola e ne migliora

l'interazione con il sito catalitico dell'enzima, in ragione dell'aumentato numero di interazioni dipolari deboli che si sviluppano<sup>45</sup>.

Le Statine di tipo II condividono un'analogia porzione HMG-like che consente loro di competere con l'HMG-CoA per il legame all'enzima HMG-CoA reduttasi. Le differenze strutturali tra le diverse molecole di questa classe risiedono prevalentemente nella porzione idrofobica e nei gruppi funzionali laterali<sup>46</sup>.

La parte idrofobica centrale è costituita da anelli aromatici rigidi e planari, in grado di inserirsi in una tasca idrofobica dell'enzima situata tra le eliche La1 e La10. Ogni molecola presenta un anello diverso, che condivide però la presenza del sostituente fluorofenilico, essenziale per l'interazione di tipo polare che sviluppa con l'Arg590 (Fig.21)<sup>46</sup>.

Le molecole in questione presentano (Fig.21):

- Atorvastatina: presenta un anello pirrolico sostituito con un gruppo isopropilico, fenilico e acetanilidico. Quest'ultimo è particolarmente rilevante poiché partecipa alla formazione di legami ad idrogeno con il residuo Ser565, contribuendo ad aumentare l'affinità per l'enzima. I gruppi isopropile e fenile, oltre a conferire maggiore idrofobicità al sistema, favoriscono l'instaurarsi di interazioni dipolari deboli all'interno della tasca enzimatica<sup>46</sup>.
- Fluvastatina: contiene un anello indolico funzionalizzato con un sostituente isopropilico. La struttura relativamente semplice ma rigida che consente una buona interazione con la regione idrofobica dell'HMG-CoA reduttasi<sup>46</sup>.
- Rosuvastatina: è caratterizzata da un anello pirimidinico funzionalizzato da un gruppo sulfonamidico, capace di formare legami a idrogeno specifici con Arg568 e Ser565. Tali interazioni contribuiscono a un'elevata affinità di legame ed a una buona selettività epatica<sup>46</sup>.
- Cerivastatina: possiede una struttura compatta, basata su un anello piridinico sostituito con due gruppi isopropilici e un gruppo etero. Nonostante l'elevata affinità per il sito attivo dell'enzima, la molecola è stata ritirata dal commercio a causa della sua elevata tossicità muscolare, attribuita in parte alla sua elevata lipofilia ed all'attività dei citocromi P450<sup>46</sup>.



Dosaggio di statine	Bassa intensità (riduzione LDL-C <30%)	Intensità moderata (riduzione LDL-C 30%– <50%)	Alta intensità (riduzione LDL-C >50%)
Atorvastatina	NA	10–20 mg	40–80 mg
Fluvastatina	20–40 mg	40 mg 2×/giorno; XL 80 mg	NA
Lovastatina	20 mg	40 mg	NA
Pitavastatina	1 mg	2–4 mg	NA
Pravastatina	10–20 mg	40–80 mg	NA
Rosuvastatina	NA	5–10 mg	20–40 mg
Simvastatina	10 mg	20–40 mg	NA

Tabella 2 – Terapia a base di Statine ad intensità bassa, moderata, alta. Dose intesa come giornaliera (NA: non assegnato)<sup>47</sup>.

### 1.7.1.2 Meccanismo d'azione

Il loro principale bersaglio molecolare è l'enzima 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA reduttasi, che catalizza la tappa limitante nella via biosintetica del colesterolo: la conversione dell'HMG-CoA in mevalonato, in presenza di NADPH come cofattore riducente. Agiscono come inibitori competitivi di questo enzima, legandosi al sito attivo ed impedendo l'accesso del substrato fisiologico<sup>46</sup>.

Le Statine si inseriscono nel sito attivo dell'enzima in modo da:

- Occupare il sito di legame dell'HMG, impedendo l'accesso del substrato<sup>46</sup>.
- Interagire tramite legami idrogeno e ionici con residui chiave dell'enzima, tra cui Ser684, Asp690, Lys691, Lys692 e Lys735, con cui la porzione carbossilica della statina forma un ponte salino<sup>46</sup>.
- Sfruttare una tasca idrofobica che si forma in seguito alla flessibilità conformazionale del tratto C-terminale dell'enzima (residui oltre Gly860), che normalmente contribuisce alla formazione della cavità per la CoA. Quando le Statine sono legate, questa regione diventa disordinata, creando una fessura che accoglie i gruppi aromatici o alifatici idrofobici delle Statine<sup>46</sup>.

L'analisi delle costanti cinetiche relative all'interazione tra Statine e HMG-CoA reduttasi evidenzia valori di costante di inibizione ( $K_i$ ) estremamente bassi, compresi tra 0,1 e 2,3 nM, a fronte di un valore di  $K_m$  per l'HMG-CoA di circa 4  $\mu$ M. Questa differenza ci conferma l'elevata affinità delle Statine per l'enzima bersaglio e la loro efficacia inibitoria anche a concentrazioni plasmatiche molto basse<sup>46</sup>.

L'inibizione della HMG-CoA reduttasi da parte delle Statine determina una riduzione della sintesi intracellulare di colesterolo, in particolare a livello epatico. Tale deplezione attiva un meccanismo compensatorio mediato dal fattore di trascrizione SREBP-2, il quale promuove non solo l'espressione dei recettori per le lipoproteine a bassa densità sulla superficie degli epatociti, ma anche quella di PCSK9. L'aumentata presenza di LDLR favorisce la captazione delle particelle LDL circolanti, con una conseguente riduzione dei livelli plasmatici di colesterolo LDL; la presenza di PCSK9 invece agisce da freno, contrastando l'eccessiva sovraesposizione degli LDLR e modulandone l'attività biologica<sup>46</sup>.

### 1.7.1.3 Aspetti farmacologici

La tabella 3 riassume le principali caratteristiche farmacologiche delle Statine attualmente approvate dalla FDA e disponibili in commercio. Le ultime molecole introdotte sul mercato sono atorvastatina (1996), rosuvastatina (2003) e pitavastatina (2009), a dimostrazione dei migliori risultati clinici e farmacologici<sup>43</sup>.

	$IC_{50}$ HMGCoA reductase (nM) <sup>a</sup>	Oral absorption (%)	Bioavailability (%)	Liver extraction (%)	Protein binding (%)	t(1/2 $\beta$ ) (h)	Vd (L/kg)	Metabolism CYP450	Transporter/s involved	Standard daily dose (mg)
Pravastatin	4	35	18	45	50	1-3	0.46	(3A4)	OATP1B1 (MRP2)	10-40
Lovastatin	2-4	30	5	$\geq 70$	$>98$	2-5	<sup>b</sup>	3A4 (2C8?)	OATP1B1	10-40
Simvastatin	1-2 (active metabolite)	60-85	$<5$	$\geq 80$	$>95$	2-5	<sup>b</sup>	3A4 (2C8, 2D6)	(MRP2)	10-40
Fluvastatin	3-10	98	30	$\geq 70$	$>98$	1-3	0.42	2C9	OATP1B1	80 (Retard formulation)
Atorvastatin	1.16	30	12	70	$>98$	7-20	$\sim 5.4$	3A4 (2C8)	OATP1B1	10-80
Rosuvastatin	0.16	50	20	63	90	20	1.7	2C9 (2C19)	OATP1B1	5-40
Pitavastatin	0.1	80	60	?	96	10-13	0.70	(2C9)	OATP1B1 (MRP2)	1-4

Tabella 3 - Parametri farmacocinetici, metabolismo, trasportatori e potenza inibitoria delle Statine attualmente in uso clinico<sup>43</sup>.

### Potenza inibitoria ( $IC_{50}$ )

L'efficacia delle Statine nell'inibire l'HMG-CoA reduttasi è espressa tramite il valore di  $IC_{50}$ , il quale rappresenta la concentrazione di farmaco necessaria per inibire del 50% l'attività di un determinato target biologico. Le Statine di più recente generazione, come Rosuvastatina (0,16 nM), Pitavastatina (0,1 nM) e Atorvastatina (1,16 nM), presentano i valori più bassi, indicando una maggiore affinità per l'enzima bersaglio. Al contrario, molecole più datate, come Pravastatina (4 nM), Lovastatina (2-4 nM), Simvastatina (1-2 nM) e Fluvastatina (3-10 nM), mostrano valori più elevati, riflettendo una minore potenza inibitoria<sup>43</sup>.

#### *Assorbimento orale e biodisponibilità*

L'assorbimento orale delle Statine è molto variabile, si va da circa il 30% per Pravastatina e Lovastatina fino al 98% per Simvastatina e Fluvastatina, influenzato dai sostituenti che compongono le molecole. Tuttavia, la biodisponibilità sistemica risulta generalmente bassa, a causa di un marcato effetto di primo passaggio epatico. In particolare, Simvastatina e Lovastatina mostrano valori inferiori al 5%, in netto contrasto con l'assorbimento orale, mentre Pravastatina raggiunge il 18%. Le Statine più recenti presentano una biodisponibilità relativamente superiore con il 20% per Rosuvastatina ed il 60% per Pitavastatina<sup>43</sup>.

#### *Estrazione epatica e legame alle proteine plasmatiche*

La maggior parte delle Statine presenta un'elevata estrazione epatica (>70%), con l'eccezione della Pravastatina (45%). Il legame alle proteine plasmatiche è generalmente molto alto (>95%), fatta eccezione per Pravastatina (circa 50%)<sup>43</sup>.

#### *Emivita plasmatica ( $t_{1/2}$ ) e volume di distribuzione ( $V_d$ )*

L'emivita plasmatica varia da 1-3 ore per Pravastatina e Fluvastatina, fino a 10-20 ore per Atorvastatina, Rosuvastatina e Pitavastatina, le quali garantiscono una durata d'azione

prolungata. Il volume di distribuzione rimane contenuto per tutte le Statine, con valori compresi tra 0,12 e 0,7 L/kg, indicando una distribuzione prevalentemente epatica<sup>43</sup>.

### *Metabolismo*

Subiscono un metabolismo differenziale da parte degli isoenzimi del citocromo P450. Lovastatina, Simvastatina, Atorvastatina e Pravastatina sono principalmente metabolizzate da CYP3A4. Fluvastatina e Pitavastatina sono substrati del CYP2C9, così come Rosuvastatina, la quale è soggetta al metabolismo sia di CYP2C9 che di CYP2C19<sup>43</sup>.

### *Trasportatori coinvolti*

Il trasporto epatico delle Statine è mediato principalmente dai trasportatori anionici organici della famiglia OATP (*organic-anion-transporting polypeptides*), in particolare OATP1B1. Molecole come Pravastatina e Pitavastatina coinvolgono anche il trasportatore MRP2 (*multidrug resistance-associated protein 2*), responsabile dell'efflusso biliare. Le varianti genetiche di OATP1B1 possono influenzare significativamente la farmacocinetica delle Statine, aumentando il rischio di eventi avversi, come la miopatia<sup>43</sup>.

### 1.7.1.4 Efficacia dose-dipendente

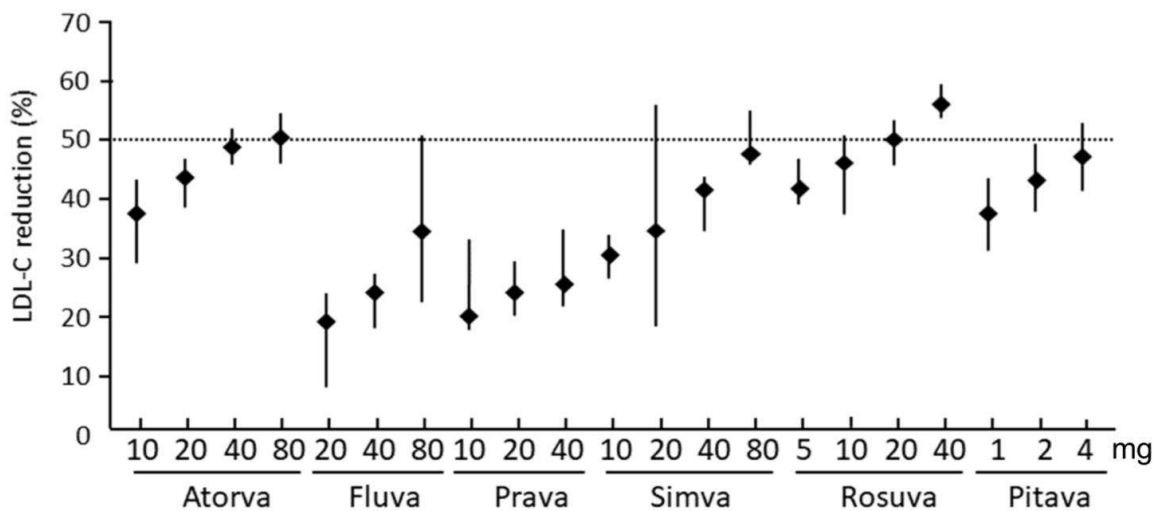


Fig. 22 - Riduzione percentuale del colesterolo LDL (LDL-C) ottenuta con diverse Statine in funzione della dose<sup>48</sup>.

Il profilo di riduzione percentuale dei livelli di colesterolo LDL, associato all'impiego delle diverse Statine (Fig.22), evidenzia differenze significative in termini di potenza ed efficacia farmacologica tra i singoli composti, confermandosi dose-dipendentemente<sup>48</sup>.

Rosuvastatina e Atorvastatina si distinguono per la loro elevata efficacia, consentendo riduzioni medie dei livelli di LDL-C superiori al 50% alle dosi di 40 mg e 80 mg, rispettivamente. Anche Pitavastatina, nonostante venga utilizzata a dosaggi nettamente inferiori (1-4 mg), dimostra un profilo di attività paragonabile a quello delle Statine ad alta intensità. Al contrario, Simvastatina e Fluvastatina risultano meno efficaci nel ridurre il colesterolo LDL, con una risposta più contenuta. Tra le Statine attualmente disponibili, Pravastatina rappresenta la molecola con la minore capacità di riduzione dell'LDL-C, confermandosi la meno potente del gruppo<sup>48</sup>.

### 1.7.1.5 Reazioni avverse

#### Diabete mellito di tipo II

La relazione tra diabete mellito di tipo II ed utilizzo di Statine è stata oggetto di studi nella metanalisi pubblicata da Rajpathak e collaboratori, i quali hanno analizzato i dati di sei trial

clinici randomizzati, per un totale di oltre 57.000 pazienti, valutando l'incidenza di nuovi casi di diabete durante il follow-up<sup>49</sup>.

L'analisi di cinque studi clinici (ad esclusione del trial WOSCOPS, che presentava criteri diagnostici non standardizzati) ha mostrato un aumento limitato ma statisticamente significativo del rischio di sviluppare diabete di tipo 2 nei pazienti trattati con Statine, con un rischio relativo (RR) di 1,13 ad intervallo di confidenza 95% compreso tra 1,03 e 1,24 ( $p = 0,007$ ), indicando un aumento statisticamente significativo del rischio di diabete. L'inclusione del WOSCOPS ha attenuato questo effetto, portando il RR a 1,06, l'intervallo di confidenza a 95%: 0,93-1,23 e rendendolo non più statisticamente significativo, oltre ad aumentare l'eterogeneità tra gli studi ( $I^2 = 57,7\%$ )<sup>49</sup>.

I meccanismi fisiopatologici alla base di questo effetto avverso sono molteplici. Le Statine, in particolare quelle lipofile come Atorvastatina e Simvastatina, possono ridurre la sensibilità insulinica interferendo con la maturazione adipocitaria e diminuendo l'espressione del trasportatore GLUT4 (*Glucose transporter type 4*), fondamentale per la captazione insulino-dipendente del glucosio. Contestualmente, si osserva una sovraregolazione di GLUT1, trasportatore insulino-indipendente, con conseguente alterazione dell'omeostasi glucidica<sup>49</sup>.

Un ulteriore meccanismo proposto riguarda la secrezione insulinica da parte delle cellule  $\beta$ -pancreatiche: è stato dimostrato che alcune Statine lipofile possono inibire i canali del calcio di tipo L, necessari per il rilascio insulinico stimolato dal glucosio. In modelli animali e nella linea cellulare MIN6, dosi elevate di Statine hanno portato ad una riduzione della secrezione insulinica, effetto non osservato con Statine idrofile come Pravastatina<sup>49</sup>.

Non è però da escludere che le Statine possano semplicemente svelare un diabete preesistente non diagnosticato, specialmente nei soggetti con alterata glicemia a digiuno o prediabete, come evidenziato nello studio JUPITER (NCT00239681), nel quale il 77% dei nuovi casi di diabete nel gruppo trattato con rosuvastatina presentava già una glicemia alterata al baseline<sup>49</sup>.

#### *Alterazione della funzione epatica*

Anche se generalmente sicure e ben tollerate, è stato descritto un ampio spettro di reazioni avverse a carico del fegato, la maggior parte delle quali di natura benigna e transitoria. Tuttavia, in una minoranza di pazienti, possono verificarsi quadri di danno epatico clinicamente rilevanti, di tipo epatocellulare, colestatico o misto<sup>50</sup>.

Le reazioni più frequentemente osservate consistono in un aumento asintomatico delle aminotransferasi (ALT e AST), tipicamente entro i primi 3 mesi dall'inizio della terapia. Queste alterazioni sono dose-indipendenti e nella maggior parte dei casi si risolvono spontaneamente anche in corso di trattamento. Solo nel 3% dei pazienti l'innalzamento delle transaminasi supera il limite superiore della norma, e in questi casi la sospensione della statina porta generalmente a normalizzare i valori<sup>50</sup>.

Nei casi più gravi, tuttavia, può verificarsi una vera epatite indotta da Statine, con un pattern prevalentemente epatocellulare. Nei pazienti si osservano aumenti significativi di ALT accompagnati da iperbilirubinemia e, occasionalmente, da sintomi sistemici come astenia, dolore addominale ed ittero. L'insorgenza è generalmente compresa tra 5 giorni e 8 mesi dall'inizio del trattamento<sup>50</sup>.

Un sottogruppo di pazienti può sviluppare un quadro clinico compatibile con epatite autoimmune indotta da farmaco (DILI), a carattere autoimmune. In questi casi sono state documentate concentrazioni elevate di autoanticorpi, ipergammaglobulinemia, e reperti istologici di epatite interfacciata con infiltrati linfoplasmocitari. La sospensione della terapia è sufficiente per placare il quadro clinico avverso<sup>50</sup>.

Rarissimi sono invece i casi di colestasi pura, con ridotto flusso biliare in assenza di necrosi epatocellulare significativa. Tali eventi possono manifestarsi con sindrome colestatica severa, talvolta prolungata, e nei casi estremi evolvere in colangite cronica o “vanishing bile duct syndrome”<sup>50</sup>.

Il meccanismo patogenetico alla base dell'epatotossicità da Statine non è ancora completamente chiarito, ma coinvolge principalmente lo stress ossidativo mitocondriale (Fig.23) e la disfunzione del metabolismo del calcio intracellulare<sup>50</sup>.

Le Statine, in particolare quelle metabolizzate dal citocromo P450 come Atorvastatina e Simvastatina, possono interferire con la catena di trasporto degli elettroni mitocondriale a

livello dei complessi I (NADH deidrogenasi), II (succinato deidrogenasi) e III (ubichinone-citocromo c reduttasi). L'inibizione di tali complessi comporta una riduzione della capacità respiratoria mitocondriale ed un incremento nella produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), principalmente del radicale superossido ( $O_2^-$ ). L'aumento di ROS è ulteriormente aggravato dall'inibizione dei centri ferro-zolfo (Fe-S) presenti nei complessi respiratori, che normalmente contribuiscono alla resistenza contro la transizione di permeabilità mitocondriale (MPT) dipendente dal calcio<sup>50</sup>.

Parallelamente, l'eccesso di superossido viene trasformato dall'enzima superossido dismutasi in perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), il quale, in condizioni fisiologiche, viene detossificato dal sistema antiossidante mitocondriale costituito da coenzima Q10, L-carnitina e creatina. In presenza di tossicità da Statine, tuttavia, l'elevata produzione di  $H_2O_2$  porta all'esaurimento di questi sistemi antiossidanti, con conseguente accumulo del perossido. L' $H_2O_2$  in eccesso promuove modificazioni ossidative a carico delle proteine di membrana mitocondriale, in particolare la transizione dei gruppi tiolici (-SH) in ponti disolfuro (S-S), che favorisce l'apertura del poro di transizione della permeabilità mitocondriale (PTP). L'apertura del PTP è un evento critico che determina il collasso del potenziale di membrana mitocondriale, la liberazione di citocromo-C e l'attivazione delle cascate apoptotiche intracellulari<sup>50</sup>.

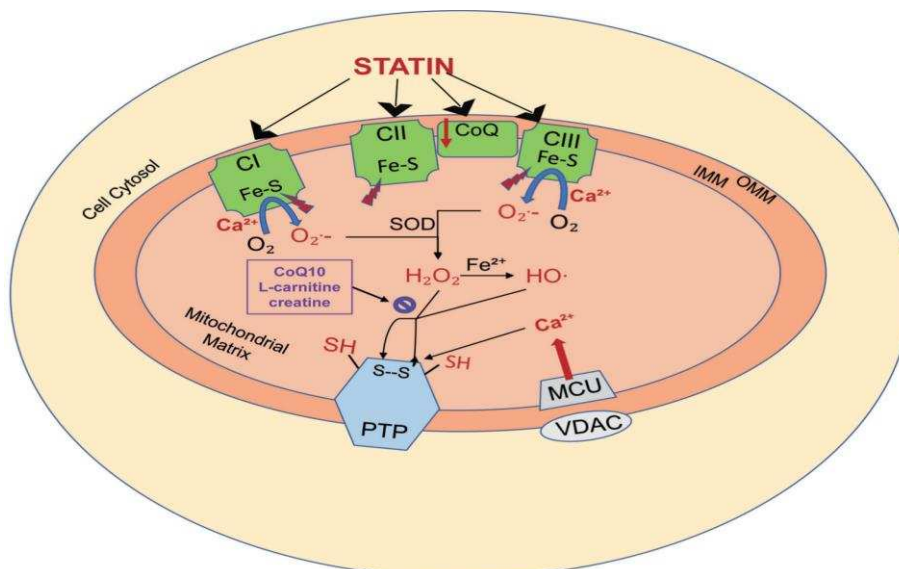


Fig. 23 - Stress ossidativo mitocondriale indotto dalle Statine<sup>50</sup>.

A ciò si aggiunge la capacità delle Statine di interferire con l'omeostasi del calcio intracellulare. Esse possono indurre il rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  dal reticolo endoplasmatico, causando un incremento della concentrazione citosolica di calcio. Questo calcio viene successivamente trasportato all'interno del mitocondrio tramite canali anionici voltaggio-dipendenti (VDAC) e tramite l'uniport mitocondriale del calcio (MCU), determinando un accumulo di  $\text{Ca}^{2+}$  nella matrice mitocondriale. Le alte concentrazioni di calcio, a loro volta, interagiscono con residui tiolici delle proteine di membrana esposti all'ambiente ossidativo, aggravando l'inibizione della funzione respiratoria mitocondriale ed incrementando ulteriormente la produzione di ROS<sup>50</sup>.

La combinazione tra stress ossidativo (Fig.23) e sovraccarico di calcio favorisce l'apertura persistente del PTP, portando alla compromissione irreversibile della funzione mitocondriale e alla conseguente morte cellulare. Questo meccanismo è stato proposto come uno dei principali responsabili del danno epatocellulare indotto da Statine nei pazienti suscettibili, specialmente in presenza di politerapie, disfunzioni mitocondriali preesistenti o predisposizione genetica<sup>50</sup>.

#### *Miopatia (patologie del tessuto muscolare)*

I sintomi muscolari associati alle Statine (SAMS) sono gli effetti collaterali più comuni delle Statine associati all'interruzione del trattamento<sup>51</sup>.

Tramite analisi cliniche sembrerebbe esserci una correlazione diretta tra la miopatia indotta da Statine ed il danno mitocondriale, con un coinvolgimento specifico della carnitina palmitoiltransferasi 2 (CPT2), enzima chiave, insieme a CPT1, nell'ossidazione degli acidi grassi a lunga catena all'interno del mitocondrio. È stato dimostrato che la carenza di CPT2 predispone i soggetti affetti, o i portatori di varianti genetiche dell'enzima, ad un maggior rischio di sviluppare miopatia associata a Statine. Sulla base di ipotesi iniziali, si è supposto che anche il meccanismo inverso potesse essere valido. Studi preliminari hanno infatti evidenziato una maggiore tendenza da parte delle Statine in forma lattonica, come la Simvastatina e la Fluvastatina, ad alterare l'espressione del trascritto di CPT2 tramite interferenze con il complesso III della catena di trasporto elettronico mitocondriale, compromettendo così la capacità respiratoria delle cellule muscolari<sup>51</sup>.

Oltre ai meccanismi mitocondriali, anche vie immunomediate di riparazione cellulare sembrano contribuire alla patogenesi della miopatia da Statine. In particolare, una variante genetica del recettore leucocitario LILRB5 (*leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B*), identificata come Asp247Gly, è stata associata ad elevati livelli sierici di creatinichinasi (CK) e lattato deidrogenasi (LDH). I soggetti omozigoti per l'allele Asp247 presentano un aumentato rischio di mialgia aspecifica, intolleranza alle Statine e miopatia correlata alle Statine, indipendentemente dall'impiego della CK come marcatore diagnostico. A livello fisiopatologico, l'allele Asp247 del gene *LILRB5* (codificante per la proteina FOXP3) è associato all'espressione della proteina FOXP3 (*forkhead box P3*) nella milza [132], fattore di trascrizione chiave per la regolazione dell'attività immunosoppressiva delle cellule T regolatorie. In una minoranza di pazienti intolleranti alle Statine, è stato ipotizzato un meccanismo autoimmune, poiché la miopatia persiste anche dopo la sospensione del trattamento e risponde positivamente alla terapia immunosoppressiva. Studi condotti in questa sottopopolazione hanno identificato la presenza di autoanticorpi diretti contro l'HMG-CoA reduttasi, i quali sono associati a una forma di miopatia necrotizzante con scarsa infiltrazione linfocitaria. Gli anticorpi anti-HMGCR sembrano indurre atrofia muscolare, e i loro livelli plasmatici risultano correlati sia alla concentrazione di CK circolante che allo stadio di attività della malattia<sup>51</sup>.

### *Rabdomiolisi*

La rabdomiolisi (Fig.24) rappresenta un evento raro ma potenzialmente letale correlato alla terapia con Statine, caratterizzato da degenerazione e necrosi delle fibre muscolari scheletriche, con rilascio massivo di mioglobina, creatinichinasi (CK) ed elettroliti nel circolo sistemico. L'incidenza stimata nei pazienti in monoterapia con Statine è di circa 1 caso ogni 22.700 trattati. Tuttavia, questo rischio può aumentare in modo significativo nei soggetti anziani e diabetici sottoposti a terapia combinata con Statine e fibrati, con una frequenza riportata di circa 1 caso ogni 484 pazienti. Emblematico è il caso della Cerivastatina assunta in associazione con Gemfibrozil, nel quale l'incidenza raggiunge valori compresi tra 9,7 e 12,7 casi ogni 1.000 pazienti trattati. Il farmaco, inizialmente ritenuto sicuro per la popolazione, è stato ritirato dal commercio grazie agli studi osservazionali condotti nella pratica clinica per l'eccessivo rischio di rabdomiolisi,

nonostante nessun caso fosse stato osservato negli studi randomizzati condotti su questa molecola<sup>52</sup>.

Il meccanismo patogenetico alla base di tale evento (Fig.24) non è ancora del tutto chiarito, ma diversi studi attribuiscono alla ridotta sintesi di ubiquinone (coenzima Q10), la causa principale. Tale molecola, un intermediario fondamentale della catena respiratoria mitocondriale, viene sintetizzata attraverso il pathway dell'HMG-CoA reduttasi. L'inibizione di questa via biosintetica ne determina la deplezione di ubiquinone, con conseguente riduzione della produzione di ATP, stress ossidativo e disfunzione energetica a livello muscolare, fattori predisponenti la morte cellulare per necrosi o apoptosi<sup>53</sup>.

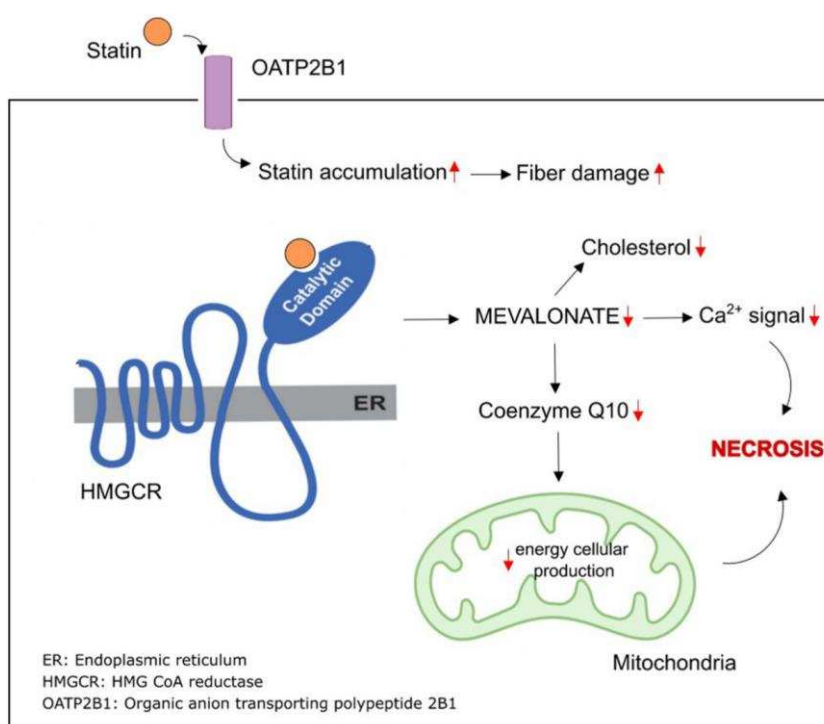


Fig. 24 – Possibile meccanismo molecolare alla base della rabdomiolisi indotta da Statine<sup>53</sup>.

Statine lipofile quali Atorvastatina, Simvastatina e Fluvastatina mostrano un profilo di miotossicità più marcato rispetto alle forme idrofile. Questi composti sono in grado di indurre, *in vitro*, la riduzione dei livelli di ATP e  $Ca^{2+}$  nel reticolo sarcoplasmatico, associati a disfunzione contrattile, attivazione di caspasi e intensificazione della proteolisi. Parallelamente, è stato osservato che le Statine ionizzate in forma anionica vengono assorbite dalle fibre muscolari attraverso specifici trasportatori di membrana appartenenti alla famiglia OATP, in particolare le isoforme OATP2B1 e OATP1a4. L'attività di questi

trasportatori favorisce l'accumulo intracellulare del farmaco, amplificando l'effetto mitotossico dose- e concentrazione-dipendente<sup>53</sup>.

### 1.7.2 Inclisiran - LEQVIO®

Inclisiran, commercializzato col nome LEQVIO® (Fig. 25), è uno small interfering RNA (siRNA) progettato per ridurre in modo mirato e prolungato i livelli plasmatici di colesterolo LDL, silenziando a livello epatico l'espressione del gene PCSK9. L'inibizione porta ad un aumento della disponibilità dei recettori LDL sulla membrana degli epatociti, favorendo la rimozione del colesterolo LDL dal circolo ematico.



Fig. 25 – Forma farmaceutica commercializzata di Inclisiran.

Il farmaco è stato approvato nel 2020 dall'EMA come coadiuvante della dieta per il trattamento di adulti affetti da ipercolesterolemia primaria, eterozigote (HeFH) o non familiare, e dislipidemia mista in combinazione con una statina in pazienti che non riescono a raggiungere gli obiettivi di LDL-C o in combinazione con altri trattamenti ipolipidemizzanti (LLT, lipid-lowering therapies) in pazienti intolleranti alle Statine o per i quali una statina è controindicata. Analogamente, negli Stati Uniti, l'inclisiran è stato approvato nel 2021 come coadiuvante della dieta e della terapia con Statine alla dose massima tollerata per il trattamento di adulti con HeFH o ASCVD clinica che necessitano di un'ulteriore riduzione dell'LDL-C.

Viene somministrato tramite un regime posologico di una prima dose al giorno zero, una seconda dose a distanza di tre mesi e, successivamente, un'unica somministrazione ogni sei mesi. Questa modalità, approvata sia da EMA che da FDA, utilizza una formulazione

in monodose contenente 284 mg di principio attivo (equivalenti a 300 mg di inclisiran sodico), in 1,5 mL di soluzione totale.

### 1.7.2.1 Sintesi industriale e struttura chimica

Il processo di sintesi di Inclisiran (Fig. 26) si basa sull'impiego della chimica 3'-O-(2-cianoetil) fosforamidite impiegata nelle sintesi di oligonucleotidi. Durante questa fase, i gruppi 5'-idrossilici dei nucleotidi vengono temporaneamente protetti mediante gruppi 4,4'-dimetossitriifenilmetil (DMT), prevenendo reazioni indesiderate. In parallelo, si introducono modificazioni mirate in posizione 2' del ribosio, quali deossigenazioni o modificazioni 2'-O-metiliche, per migliorare la resistenza alle nucleasi e la stabilità complessiva della molecola<sup>54</sup>.

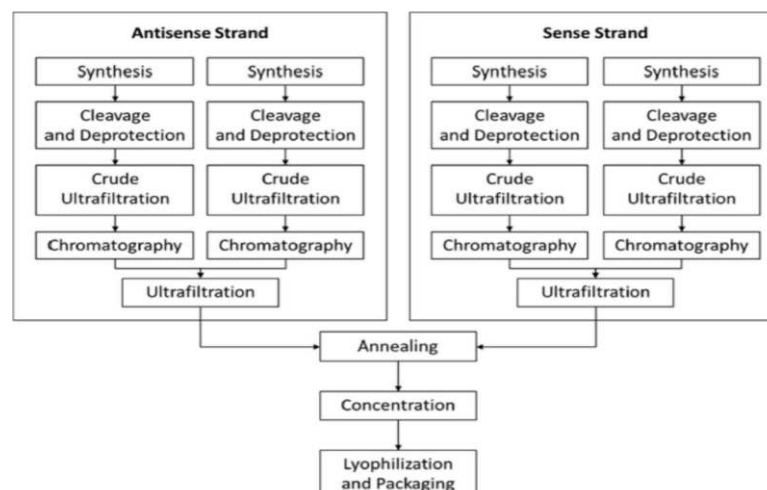


Fig. 26 - Fasi principali del processo di produzione del farmaco<sup>54</sup>.

La sintesi avviene in fase solida: il filamento senso è assemblato su un supporto polimerico contenente il ligando GalNAc (triantenaria N-acetilgalattosammina), che ne permette il successivo targeting epatico attraverso il recettore della asialoglicoproteina (ASGPR). Parallelamente, il filamento antisense è costruito su supporto di vetro microporoso funzionalizzato con un residuo di adenosina modificata in 2'-O-metil<sup>54</sup>.

Completata la sintesi, i due filamenti vengono deprotetti, separati dai supporti solidi e sottoposti a ultrafiltrazione e purificati mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC). Infine, dopo una seconda ultrafiltrazione, vengono poi miscelati in rapporto equimolare e sottoposti ad annealing, ottenendo il duplex funzionale<sup>54</sup>.

Il risultato di questo processo è una molecola (Fig.27) costituita da:

- Un nucleotide 2'-desossi;
- 11 nucleotidi modificati con un gruppo 2'-fluoro;
- 32 nucleotidi presentanti una modifica 2'-O-metilica.

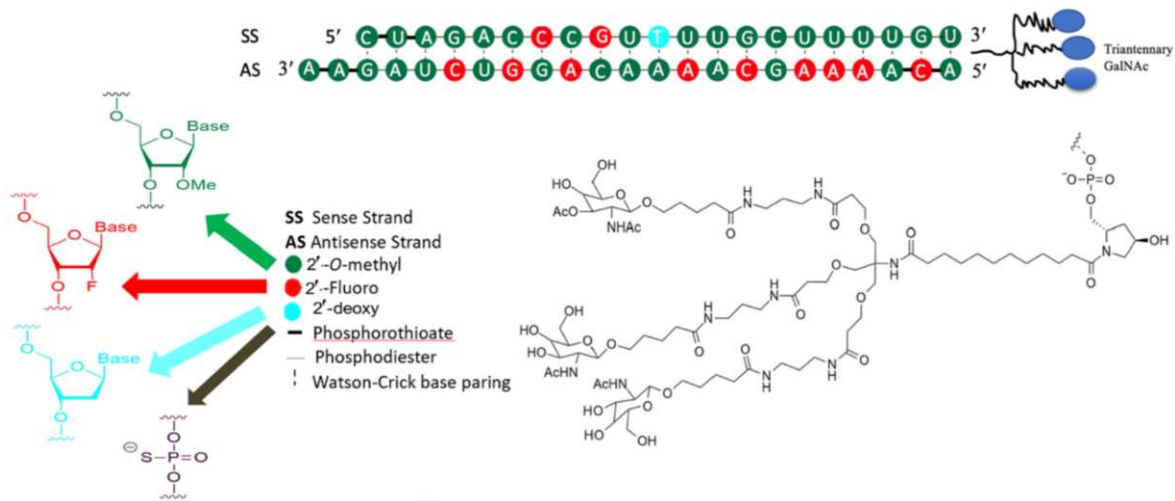


Fig. 27 –Struttura chimica di Inclisiran<sup>55</sup>.

La presenza di queste modificazioni è fondamentale per superare la naturale instabilità dei siRNA non modificati. Infatti, in assenza di modifiche, i ribonucleotidi risultano altamente suscettibili all'azione delle esonucleasi presenti nel siero<sup>54</sup>.

In particolare, la combinazione delle modificazioni in posizione 2' del ribosio, ovvero 2'-fluoro e 2'-O-metil, conferisce ad Inclisiran una notevole resistenza alla degradazione enzimatica, preservando al contempo la sua capacità di essere riconosciuto e incorporato nel complesso silenziatore indotto dall'RNA (RISC). Infine, i legami fosfodiesterici alle estremità della molecola vengono parzialmente sostituiti con legami fosforotioati, che aumentano ulteriormente la stabilità della molecola nei confronti delle esonucleasi sieriche<sup>54</sup>.

### 1.7.2.2 Meccanismo d'azione

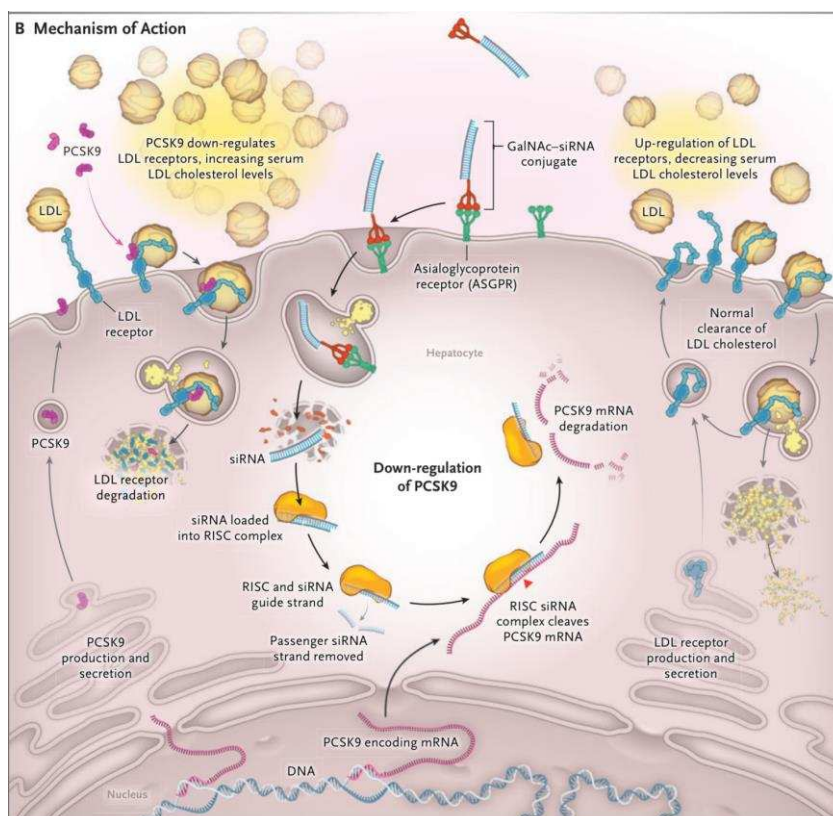


Fig. 28 – Meccanismo d'azione del farmaco Inclisiran<sup>56</sup>.

Il farmaco è progettato specificamente per colpire l'mRNA di PCSK9 a livello epatico (Fig.28). Per garantire una somministrazione mirata agli epatociti, Inclisiran è coniugato con residui di N-acetilgalattosamina (GalNAc), un monosaccaride che conferisce alta affinità per il recettore delle asialoglicoproteine, espresso in maniera abbondante sulla superficie delle cellule epatiche. ASGPR è una proteina transmembrana composta da due subunità, una subunità maggiore, ASGR1, e una subunità minore, ASGR2. L'interazione tra GalNAc e ASGPR facilita l'endocitosi mediata da recettore, un processo fisiologico attraverso il quale gli epatociti internalizzano glicoproteine prive di acido sialico<sup>57</sup>.

Una volta all'interno del citoplasma degli epatociti, Inclisiran viene incorporato nel complesso RISC, una ribonucleoproteina responsabile del silenziamento genico mediato da RNA a interferenza. L'interazione tra il siRNA e l'mRNA avviene secondo un principio di complementarità di sequenza, che permette l'attività endonucleasica dell'enzima Argonaute, componente centrale del RISC. Il processo si articola attraverso l'azione di specifici domini della proteina Argonaute: il dominio PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) si lega

selettivamente all'estremità 3' del siRNA, mentre il dominio Mid interagisce con l'estremità 5' grazie alla presenza di uno ione  $Mg^{2+}$  bivalente, ed entrambi contribuiscono alla stabilizzazione del complesso RNA-proteina e al corretto posizionamento del siRNA<sup>58</sup>.

Successivamente, interviene il dominio PIWI, che contiene il sito attivo responsabile del taglio dell'mRNA target. L'attività catalitica di questo dominio è mediata da un gruppo DDH, costituito da due residui di aspartato e uno di istidina, i quali coordinano ioni metallici necessari per l'idrolisi dei legami fosfodiesterici dell'mRNA bersaglio<sup>58</sup>.

Attraverso l'inibizione della sintesi di PCSK9, Inclisiran impedisce la degradazione dei recettori LDL, favorendone il riciclo e l'esposizione sulla superficie cellulare. Di conseguenza, aumenta l'efficienza di captazione del colesterolo LDL dal plasma e ne riduce significativamente la concentrazione circolante.

### **1.7.2.3 Farmacocinetica**

#### *Assorbimento*

Gli studi di fase I, in particolare lo studio ALN-PCSSC-001, hanno messo in evidenza una farmacocinetica lineare del farmaco Inclisiran. È stata infatti osservata (Fig.29) una proporzionalità diretta tra la dose somministrata e le concentrazioni plasmatiche sistemiche, nell'intervallo di dosaggio compreso tra 25 e 800 mg. Dopo la somministrazione, le concentrazioni plasmatiche hanno evidenziato una fase iniziale di plateau, che si è protratta per alcune ore, seguita da una progressiva riduzione dei livelli plasmatici fino al ritorno ai valori basali entro 24 ore. Nei diversi studi clinici condotti, inclusi quelli a dose singola (SAD), a dosi multiple (MD), e quelli su pazienti con insufficienza renale o epatica, il tempo mediano per raggiungere la concentrazione sierica massima (Tmax) è risultato compreso tra le 4 e le 8 ore. Nel corso della somministrazione a dosi multiple (MD), non sono stati riscontrati accumuli significativi di Inclisiran, sfruttando analisi dei profili concentrazione-tempo (Figura 28). Gli schemi di trattamento utilizzati comprendevano: quattro somministrazioni settimanali da 125 mg (QW), due somministrazioni quindicinali da 250 mg (Q2W) e due somministrazioni mensili da 300 mg o 500 mg (Q4W)<sup>59</sup>.

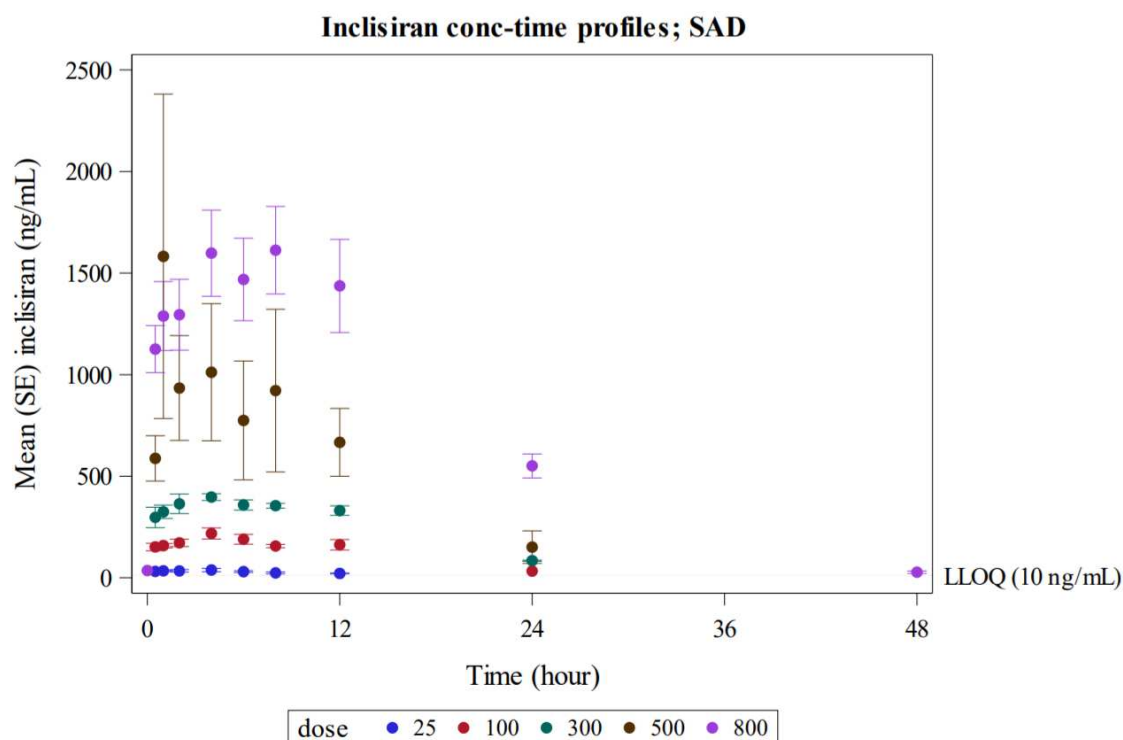


Fig. 29 - Profilo medio ( $\pm$  errore standard) della concentrazione di Inclisiran in funzione del tempo dopo somministrazione singola (SAD)<sup>59</sup>.

### Distribuzione

Una volta in circolo, Inclisiran si lega per circa l'87% alle proteine plasmatiche, sia alla concentrazione di 0,5  $\mu\text{g/mL}$  che di 1  $\mu\text{g/mL}$ . Ciò dovrebbe limitare la frazione di farmaco libera nel sangue, ma la presenza della struttura GalNac garantisce un'elevata affinità per il recettore epatico ASGPR, promuovendo una captazione mirata da parte degli epatociti<sup>59</sup>. Il volume apparente di distribuzione al dosaggio dei 300 mg varia tra 421 e 553 L, indicativo di una distribuzione ampia nei compartimenti periferici. Studi non clinici hanno evidenziato che, rispetto al plasma (emivita di 0,9–1,8 h), Inclisiran permane molto più a lungo nel fegato (emivita: 53–191 h) e nel rene (244–685 h) (Fig.30), confermando la sua localizzazione negli organi target<sup>59</sup>.

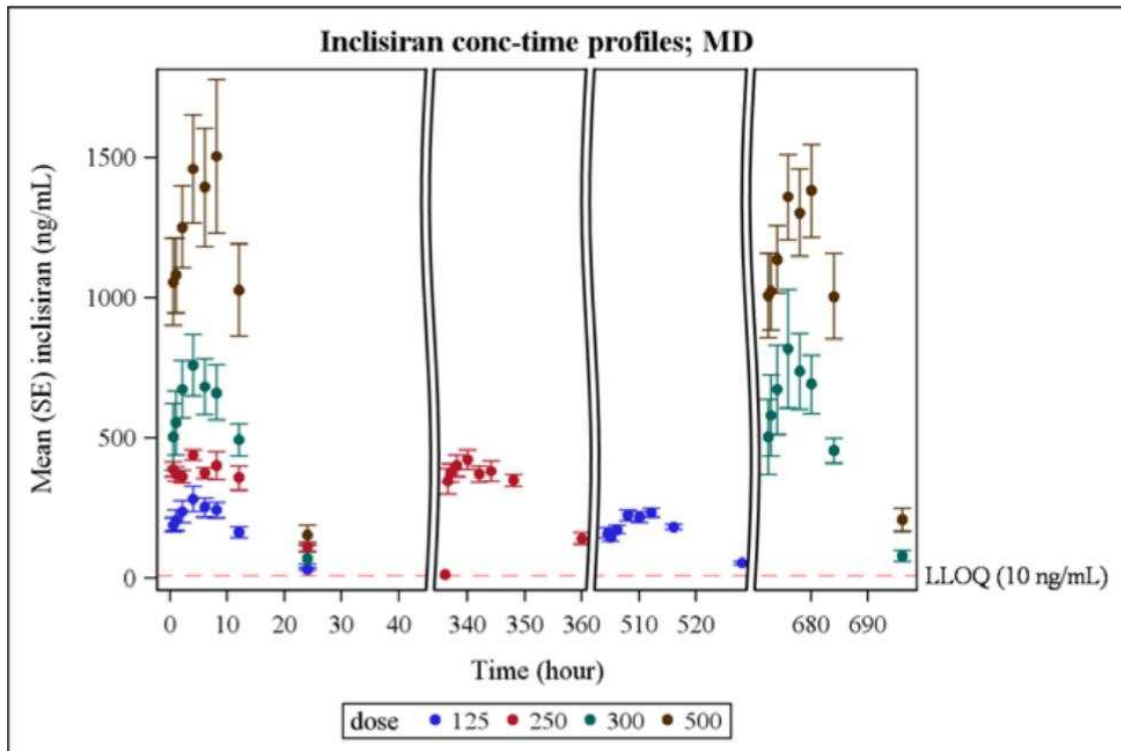


Fig. 30 - Profilo medio ( $\pm$  errore standard) della concentrazione di Inclisiran in funzione del tempo in seguito a diversi regimi di somministrazione multipla (MD)<sup>59</sup>.

### Metabolismo

Inclisiran non è metabolizzato dai classici enzimi del citocromo P450 (CYP), né inibisce o induce i principali isoenzimi CYP o trasportatori. La sua biotrasformazione avviene prevalentemente tramite esonucleasi, che degradano le estremità del filamento antisense, generando i metaboliti AS(n-1) e AS(n-2). Tra questi, AS(n-1) rappresenta il principale metabolita identificato negli studi umani<sup>59</sup>.

Nel trial ORION-7, condotto su soggetti con insufficienza renale, la concentrazione di AS(n-1) ha rappresentato l'11%, 27% e 86% dei livelli di Inclisiran rispettivamente a 0,5, 8 e 48 ore post-dose (Fig.31). Il metabolita AS(n-2) non è stato rilevato. L'esposizione al metabolita AS(n-1) è risultata sempre inferiore rispetto al farmaco intatto e rientrava nei limiti di sicurezza stabiliti negli studi preclinici<sup>59</sup>.

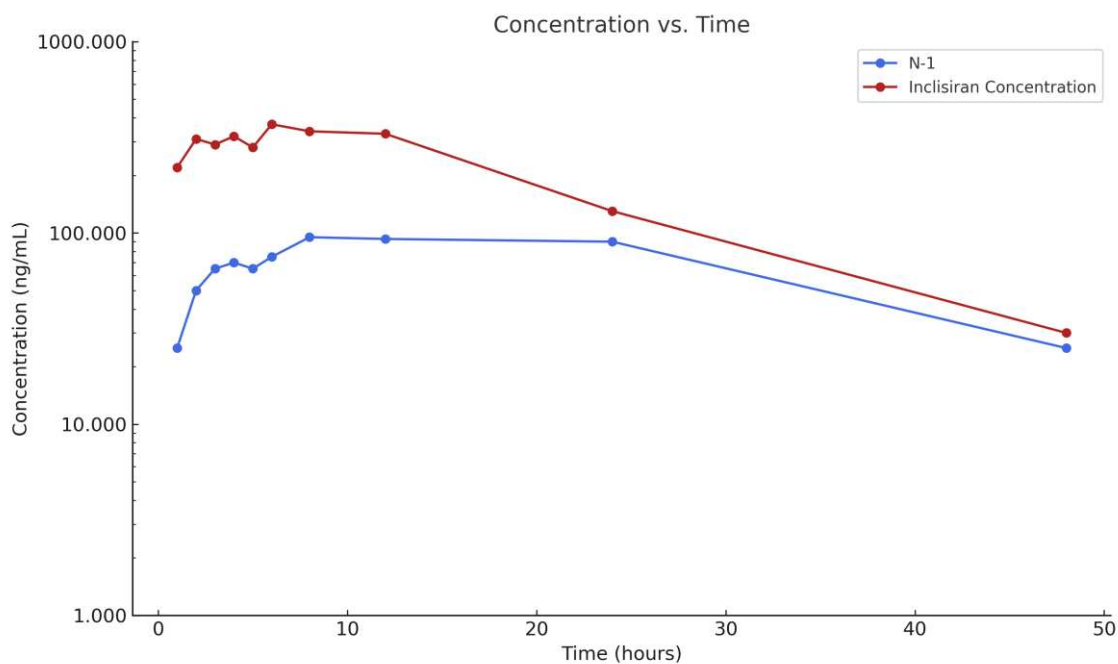


Fig. 31 – Concentrazione di Inclisiran e AS(n-1) in ORION 7<sup>59</sup>.

### Eliminazione

Inclisiran presenta un'emivita apparente di circa 7 ore in seguito alla somministrazione sottocutanea di una dose da 300 mg. L'eliminazione avviene prevalentemente per via renale, con una quota compresa tra il 13% e il 21% della dose escreta immodificata nelle urine. Studi condotti su macachi, utilizzando Inclisiran radiomarcato con [<sup>14</sup>C], hanno evidenziato che entro 7 giorni il 32% della radioattività totale veniva eliminata attraverso le urine, mentre solo l'1,6% veniva recuperato nelle feci<sup>59</sup>.

#### 1.7.2.4 Studi clinici

##### ORION 1 (NCT02597127) & ORION 3 (NCT03060577)

Il primo studio clinico condotto è stato ORION-1, trial clinico di fase II, randomizzato, in doppio cieco e controllato con placebo, in cui è stata valutata l'efficacia di inclisiran sodico nella riduzione dei livelli plasmatici di colesterolo LDL e PCSK9 in pazienti affetti da ASCVD o a elevato rischio di svilupparla, nonostante l'assunzione della massima dose tollerata di Statine, con o senza altre LLT<sup>60</sup>.

Lo studio ha coinvolto un totale di 501 pazienti, suddivisi in due principali categorie: soggetti in prevenzione secondaria (affetti da ASCVD) e soggetti in prevenzione primaria ad alto rischio, comprendenti pazienti con diabete mellito di tipo 2, ipercolesterolemia familiare (FH) o rischio cardiovascolare decennale pari o superiore al 20%, secondo la valutazione del Framingham Risk Score. Il protocollo stabiliva come criterio di inclusione livelli minimi di LDL-C differenti tra i due gruppi: >70 mg/dL nei soggetti con ASCVD e  $\geq 100$  mg/dL nei soggetti ad alto rischio<sup>60</sup>.

I pazienti sono stati trattati con una dose singola sottocutanea di inclisiran (200, 300 o 500 mg) al giorno 1, oppure con due dosi suddivise (100, 200 o 300 mg) somministrate nei giorni 1 e 90. Tutti i regimi terapeutici testati hanno mostrato una riduzione significativa e statisticamente rilevante ( $p < 0,001$  rispetto al placebo) dei livelli plasmatici di colesterolo LDL e PCSK9 (Fig.32), con il massimo effetto osservato nel gruppo trattato con due dosi da 300 mg. In particolare, la riduzione media dei minimi quadrati (LSM) dei livelli di colesterolo LDL al giorno 180 è stata:

- 52,6% con due dosi da 300 mg;
- 44,9% con due dosi da 200 mg;
- 41,9% con una dose da 500 mg;
- 38,4% con una dose da 300mg;
- 35,5% con due dosi da 100 mg;
- 27,9% con una dose da 200 mg.

Un andamento analogo è stato osservato per la riduzione dei livelli sierici di PCSK9 al giorno 180 (Fig.32), con una LSM rispetto al basale del:

- 69,1% con due dosi da 300 mg;
- 66,2% con due dosi da 200 mg;
- 59,3% con una dose da 500 mg;

- 56,0% con una dose da 300 mg;
- 53,2% con due dosi da 100 mg;
- 47,9% con una dose da 200 mg.

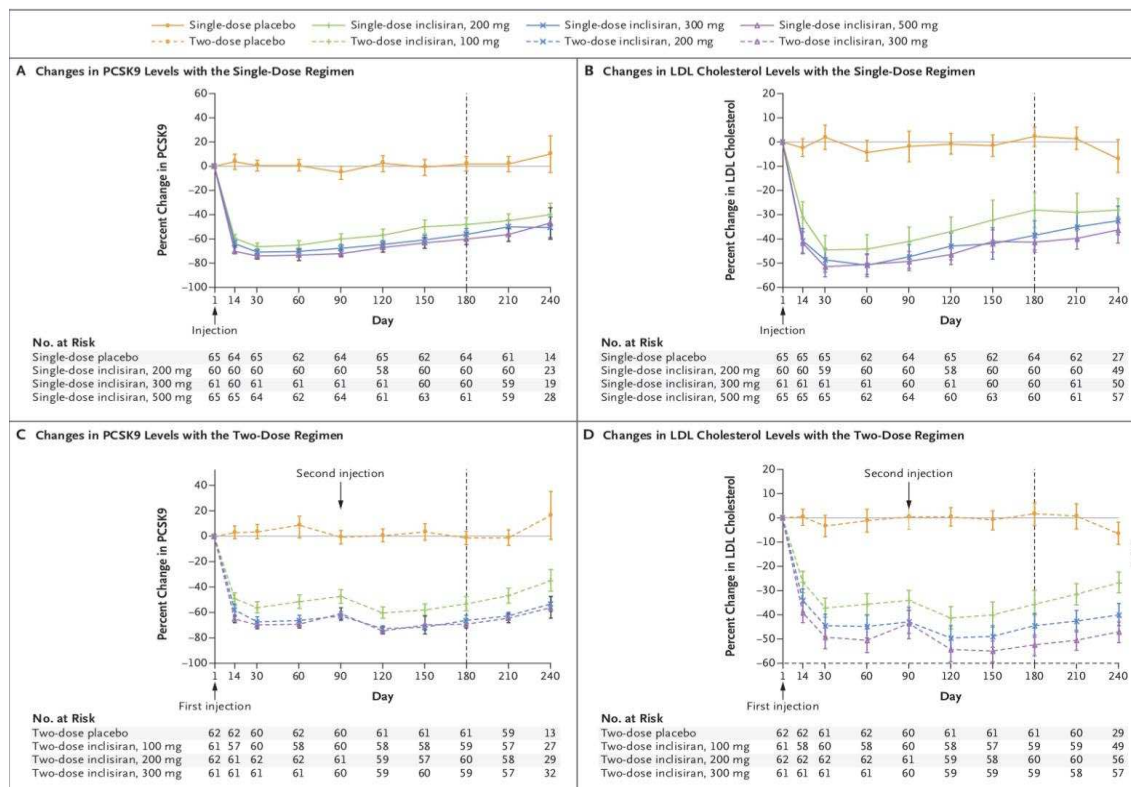


Fig. 32 - Effetto di Inclisiran sui livelli di PCSK9 e sui livelli di colesterolo LDL<sup>60</sup>.

Interessante notare che già al giorno 14 le riduzioni di LDL-C e PCSK9 siano comparabili a quelle rilevate ai giorni 30 e 60. In seguito, i livelli sierici mostrano una lieve tendenza a risalire verso i valori basali, annullata però dalla somministrazione della seconda dose al giorno 90, capace di ristabilire un effetto terapeutico simile a quello iniziale e mantenerlo fino al giorno 180<sup>60</sup>.

L'efficacia a lungo termine di inclisiran è stata confermata anche dallo studio di fase II ORION-3, della durata di 4 anni, in aperto, condotto su 290 pazienti che avevano completato il trattamento nello studio ORION-1. Il protocollo era diviso in due bracci:

- Braccio Inclisiran: pazienti che avevano già ricevuto Inclisiran 300 mg nello studio ORION-1<sup>61</sup>.

- Braccio di transizione: pazienti inizialmente trattati con placebo in ORION-1, passati ad Evolocumab (mAb; 140 mg ogni 2 settimane) per 12 mesi, ed infine ad Inclisiran per i restanti 36 mesi<sup>61</sup>.

L'utilizzo di Evolocumab (Fig.33) ha permesso ai pazienti trattati con placebo in ORION-1 di sfruttare un trattamento efficace per un anno, così da riequilibrare i benefici farmacologici e poter valutare l'efficacia e sicurezza del passaggio da un anti-PCSK9 ad un siRNA. Il metodo ha portato ad una riduzione di LDL-C del 61% nel primo anno, mantenuta intorno al 45,3% nei successivi 3 anni<sup>61</sup>.

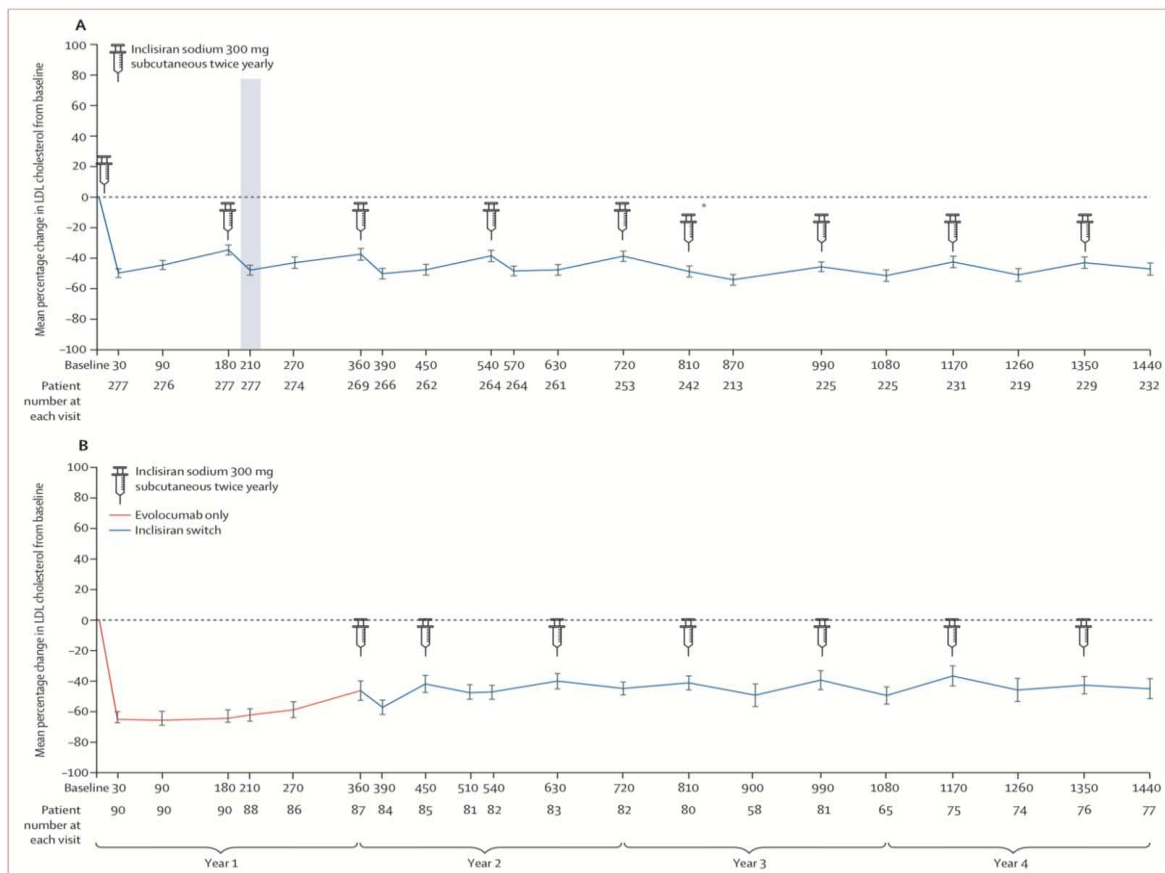


Fig. 33 – (A) Variazione percentuale media del colesterolo LDL dal basale di ORION-1 al giorno 1440 (4 anni) di ORION-3 (braccio solo Inclisiran); (B) dal basale di ORION-3 al giorno 1440 (4 anni) di ORION-3 (braccio di passaggio)<sup>61</sup>.

Nel complesso, al giorno 210, la riduzione media dei livelli di LDL-C, rispetto al basale (giorno 1 di ORION-1), è stata del 47,5% nei 277 pazienti con valutazioni disponibili. Su un periodo di 4 anni, la riduzione media dei livelli di LDL-C è stata del 44,2%, mentre la riduzione media dei livelli di PCSK9 è risultata pari al 69,5%<sup>61</sup>.

Dopo aver confermato l'efficacia e la sicurezza di inclisiran, anche nel lungo periodo, attraverso studi iniziali, sono stati avviati ulteriori trial clinici per valutarne l'effetto in popolazioni affette da specifiche condizioni patologiche. In quest'ottica sono stati progettati tre studi di fase III, ORION-9, ORION-10 e ORION-11, tutti randomizzati, in doppio cieco e controllati con placebo, condotti rispettivamente in pazienti con HeFH, ASCVD ed in soggetti a rischio cardiovascolare equivalente<sup>61</sup>.

#### *ORION-9 (NCT03397121)*

Lo studio ORION-9, multicentrico, randomizzato e controllato con placebo, è stato condotto in Europa e Sudafrica e ha coinvolto 482 pazienti adulti con diagnosi di HeFH. I partecipanti presentavano livelli sierici di colesterolo LDL  $\geq 100$  mg/dL, nonostante fossero in trattamento con Statine alla massima dose tollerata, in monoterapia o in combinazione con altri farmaci ipolipemizzanti, come ezetimibe. I soggetti che non assumevano Statine dovevano documentare un'intolleranza a tutte le dosi di almeno due Statine diverse<sup>62</sup>.

I pazienti hanno ricevuto in modo casuale Inclisiran 300 mg o placebo mediante iniezione sottocutanea nei giorni 1, 90, 270 e 450, con visita di follow-up finale al giorno 510 (Fig.34). Gli endpoint co-primari di efficacia comprendevano la variazione percentuale del LDL-C rispetto al basale al giorno 510 e la variazione percentuale media, corretta per il tempo, tra i giorni 90 e 540<sup>62</sup>.

Il farmaco ha determinato una riduzione significativa dei livelli di LDL-C pari al 48% al giorno 510 e al 44% nella media temporale tra i giorni 90 e 540, rispetto al placebo (Fig.34). Questi risultati sono stati coerenti anche nei diversi sottogruppi di pazienti, differenziati in base all'uso di Statine, all'intensità della terapia ipolipemizzante e al profilo genetico dell'ipercolesterolemia. In particolare, la riduzione dell'LDL-C ha superato il 48% nei pazienti in terapia con Statine, raggiungendo un massimo del 50,7% nei soggetti trattati con Statine ad alta intensità<sup>62</sup>.

Oltre al colesterolo LDL, inclisiran ha prodotto una riduzione significativa dei livelli di colesterolo totale, colesterolo non-HDL, apolipoproteina B (ApoB) e della proteina PCSK9, i cui livelli si sono ridotti in media del 78,4% rispetto al placebo al giorno 510. Gli effetti sui livelli di trigliceridi e di lipoproteina(a) [Lp(a)] sono stati oggetto di analisi separate<sup>62</sup>.

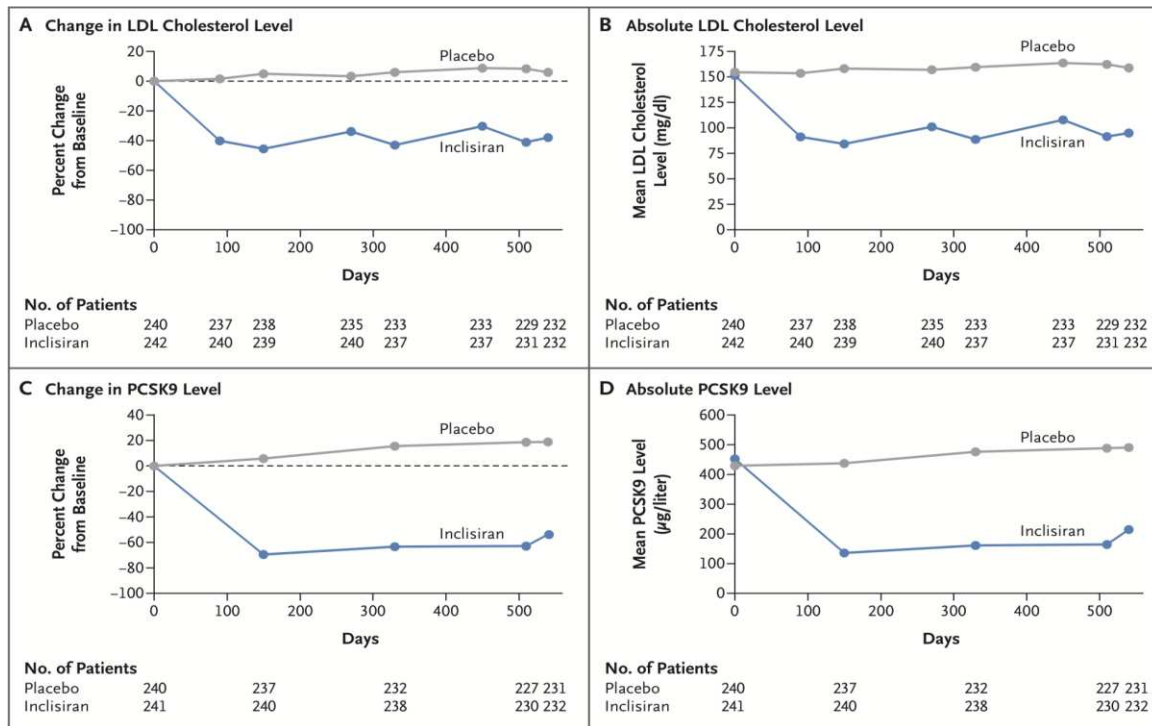


Fig. 34 - Variazioni percentuali e assolute dei livelli di colesterolo LDL (lipoproteine a bassa densità) e PCSK9 durante il periodo di prova di 540 giorni<sup>62</sup>.

### ORION-10 (NCT03399370) & ORION-11(NCT03400800)

Gli studi clinici ORION-10 e ORION-11 hanno valutato l'efficacia e la sicurezza di Inclisiran rispettivamente in pazienti affetti da ASCVD e ad alto rischio equivalente (ASCVD RE), con livelli elevati di colesterolo LDL ( $\geq 70$  mg/dL per ASCVD; 100 mg/dL per ASCVD RE) nonostante l'assunzione della massima dose tollerata di Statine, con o senza altre LLT concomitanti.

ORION-10 è stato condotto negli Stati Uniti ed ha coinvolto 1561 pazienti, mentre ORION-11 si è svolto in Europa e Sudafrica, con un totale di 1617 partecipanti. In entrambi i trial, i pazienti sono stati randomizzati in rapporto 1:1 a ricevere inclisiran 300 mg o placebo,

mediante quattro somministrazioni sottocutanee programmate nei giorni 1, 90, 270 e 450. Il follow-up primario si è concluso al giorno 510 (mese 17), mentre la visita di fine studio è stata effettuata al giorno 540 (mese 18)<sup>63</sup>.

Gli endpoint co-primari consistevano nel valutare la variazione percentuale del colesterolo LDL rispetto al basale al giorno 510 e la variazione percentuale media del LDL-C corretta per il tempo tra i giorni 90 e 540. Inclisiran ha prodotto una riduzione continuativa dei livelli di LDL-C di circa il 50% rispetto al placebo in entrambi gli studi. Questo effetto si è mantenuto stabile nei diversi sottogruppi analizzati, compresi quelli distinti per età, sesso, terapia con Statine, comorbidità metaboliche e funzione renale<sup>63</sup>.

Nello specifico, ORION-10 ha riportato una riduzione del LDL-C al giorno 510 del (Fig.35):

- 57,0% nella popolazione totale;
- 57,3% nei pazienti in terapia con Statine;
- 58,2% nei pazienti che ricevono Statine ad alta intensità.

ORION-11 invece (Fig.35):

- 52,7% nella popolazione totale;
- 53,3% nei pazienti con ASCVD;
- 47,2% nei pazienti con ASCVD RE.

Sono state osservate anche variazioni nei livelli di trigliceridi e Lp(a), oltre che ai livelli di PCSK9, ridotti in media dell'83,3% (ORION-10) e del 79,3% (ORION-11) (Fig.36)<sup>63</sup>.

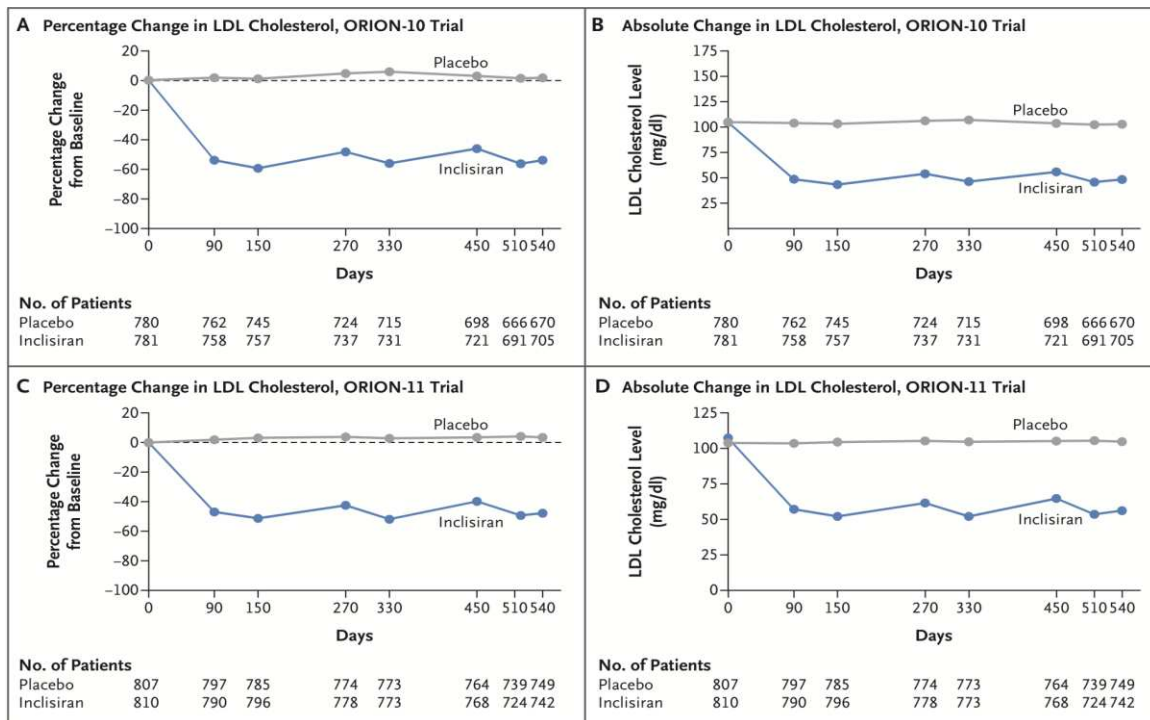


Fig. 35 - Efficacia di Inclisiran o placebo nella riduzione dei livelli di LDL-C durante il periodo di sperimentazione di 540 giorni<sup>63</sup>.

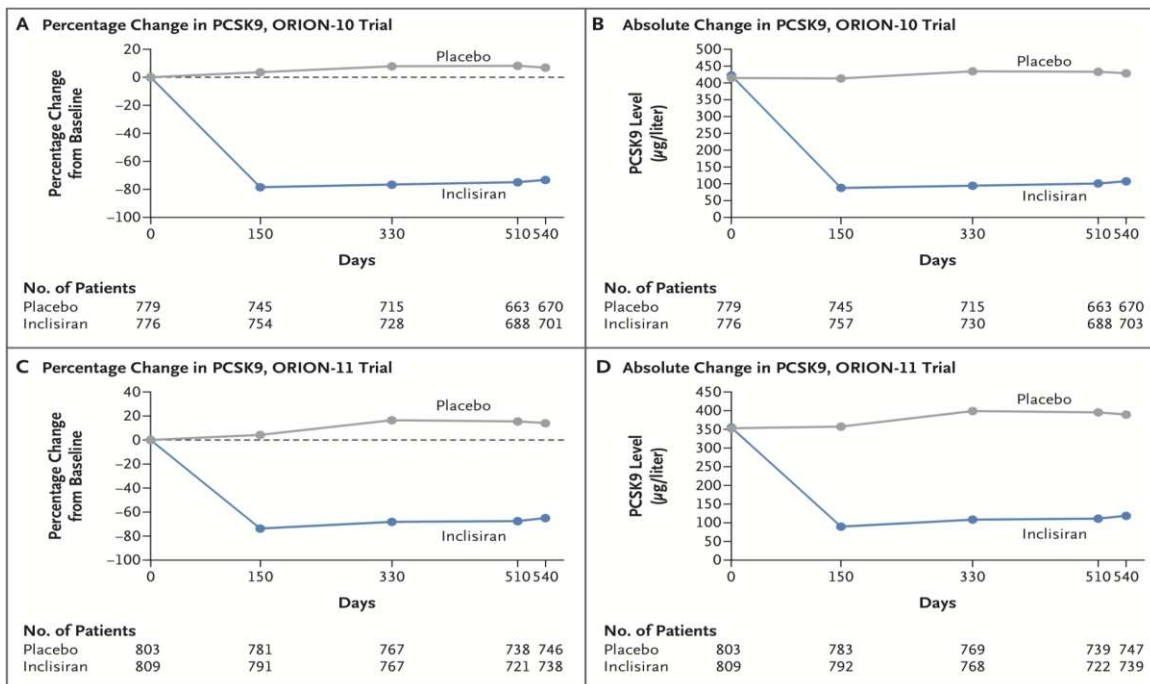


Fig. 36 - Efficacia di Inclisiran o placebo nella riduzione dei livelli di PCSK9 durante il periodo di sperimentazione di 540 giorni<sup>63</sup>.

	Trial identifier	Population	Primary endpoint	Main findings
ORION-1	NCT02597127	Participants with cardiovascular disease and high cholesterol	% change in LDL-C	The 2-dose 300-mg regimen produced the highest proportion of responders at day 360 and the greatest mean reduction in LDL-C over 1 year [37, 38]
ORION-2	NCT02963311	Homozygous familial hypercholesterolemia	% change in LDL-C	Review of data from these four participants provided sufficient data to justify a long-term phase 3 trial (ORION-5)
ORION-3	NCT03060577	4-year follow-up of ORION-1	% change in LDL-C	The 4-year averaged mean reduction of LDL-C cholesterol was 44.2% (95% CI: 47.1–41.4)
ORION-4	NCT03705234	ASCVD	Major adverse cardiac events	Estimated study completion (July 2026)
ORION-5	NCT03851705	Homozygous familial hypercholesterolemia	% change in LDL-C	Ongoing
ORION-6	-	Patients with mild (Child-Pugh A) or moderate (Child-Pugh B) hepatic impairment and with normal hepatic function	Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile	The exposure of inclisiran increased by up to two-fold in patients with moderate hepatic impairment. Pharmacodynamic effects remained relatively unchanged
ORION-7	NCT03159416	Comparing patients with renal impairment and normal renal function	Pharmacokinetic parameters	Dose adjustments of inclisiran are not required in these patients
ORION-8	NCT03814187	Patients with established ASCVD or very high risk of ASCVD (familial hypercholesterolemia or type 2 diabetes) and elevated LDL-C. It is open-label, active comparator extension trial of the ORION-3, ORION-9, ORION-10, and ORION-11 trials	Proportion of patients reaching LDL-C goals (<70 mg/dL or <100 mg/dL) based on the ASCVD risk level by day 1080	Among 3274 patients, the longest exposure to inclisiran was 6.84 years with a mean exposure of 3.7 years 79.4% of ASCVD patients reached LDL-C < 70 mg/dL and 74.3% of ASCVD risk equivalent reached LDL-C < 100 mg/dL LDL-C was reduced from baseline by 51% (95% CI 52.2–49.9) in ASCVD patients and by 42.4% (95% CI 45–39.9) in ASCVD risk equivalent patients
ORION-9	NCT03397121	Heterozygous familial hypercholesterolemia	% change in LDL-C	LDL-C was reduced by 47.9% at day 510
ORION-10	NCT03399370	ASCVD and elevated LDL-C	Absolute change in LDL-C	Reductions in LDL-C levels of approximately 50%
ORION-11	NCT03400800	ASCVD or ASCVD-risk equivalents and elevated LDL-C	Absolute change in LDL-C	Reduction in LDL-C levels of approximately 50%
ORION-12	Registration of this phase I trial was not required as it is not an applicable clinical trial according to current US regulatory guidance	48 healthy volunteers	To determine whether a supratherapeutic dose of inclisiran had any effect on cardiac repolarization	Inclisiran, at a supratherapeutic dose (900 mg), did not show a clinically significant effect on the QT interval
ORION-13	NCT04659863	Adolescents with homozygous familial hypercholesterolemia	% change in LDL-C	Not available
ORION-14	NCT04774003	Chinese patients with hypercholesterolemia (LDL-C ≥100 mg/dL) who were on maximally tolerated statin	Safety, pharmacokinetics and LDL-C lowering effects	Single dose of 100 and 300 mg, significantly reduced LDL-C levels up to day 96
ORION-16	NCT04652726	Adolescents with heterozygous familial hypercholesterolemia	% change in LDL-C	Not available
ORION-18	NCT04765657	Asian Participants with ASCVD or ASCVD high risk and elevated LDL-C	% change in LDL-C	Not available
VICTORION-2 PREVENT	NCT05030428	Participants with established cardiovascular disease	Reduction in the risk of 3-point major adverse cardiac events: a composite of CV death, non-fatal myocardial infarction, and non-fatal ischemic stroke	Estimated study completion 2027
VICTORION- INCEPTION	NCT04873934	Patients with a recent acute coronary syndrome	% change in LDL-C	Not available

Fig. 37 – Lista degli studi che valutano la sicurezza e l'efficacia dell'inclisiran <sup>63</sup>.



## 2. Scopo

Inclisiran ha dimostrato efficacia clinica riducendo la produzione epatica e i livelli circolanti di PCSK9, determinando un aumento dell'espressione del recettore per le LDL. Questo studio, effettuato su cellule di epatocarcinoma umano HepG2, si propone di valutare, a varie tempistiche, l'espressione proteica e trascrizionale di PCSK9 e LDLR a seguito di trattamento con dosi crescenti di Inclisiran in singolo o in combinazione con dosi fisse di Simvastatina. Lo scopo è quello di effettuare una valutazione preclinica per un eventuale suo possibile impiego nella sindrome coronarica acuta (SCA).

Un importante riferimento in questo ambito è rappresentato dallo studio clinico VICTORION-INCEPTION (NCT04873934), presentato al congresso dell'American Heart Association (AHA) nel maggio 2025. Si tratta di uno studio open-label, randomizzato di fase 3b, della durata di 330 giorni, che ha evidenziato come nei pazienti post-SCA con LDL-C  $\geq 70$  mg/dL (o colesterolo non-HDL  $\geq 100$  mg/dL), nonostante terapia standard, l'aggiunta di Inclisiran abbia comportato una riduzione del colesterolo LDL del 45,6% rispetto all'1,4% osservato nel gruppo controllo.

Poiché i livelli plasmatici di PCSK9 tendono ad aumentare rapidamente dopo un evento acuto, questa tesi intende valutare il possibile ruolo di Inclisiran come trattamento precoce, in combinazione alla terapia standard, nei pazienti con sindrome coronarica acuta.



### ***3. Materiali e Metodi***

Gli esperimenti sono stati condotti sulla linea cellulare umana HepG2, derivata da un epatocarcinoma ben differenziato. Questa linea è stata isolata nel 1975 da un campione di tessuto epatico prelevato da un paziente maschio caucasico di 15 anni, originario dell'Argentina<sup>64</sup>.

Le cellule HepG2 crescono in adesione, formando tipicamente sia strutture tridimensionali (cluster) sia monostrati bidimensionali (2D). La crescita è stata condotta in piastre Petri con 100 mm di diametro e 20 mm di altezza, mantenendole a 37°C in incubatore con atmosfera controllata: 90% di umidità relativa e 5% di CO<sub>2</sub>. Le cellule sono state coltivate in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ad alta concentrazione di glucosio (EuroClone S.p.A), supplementato con i seguenti additivi:

- 10% v/v di FBS (siero fetale bovino inattivato a 56°C per 30 minuti e successivamente filtrato, EuroClone S.p.A);
- 1% v/v di L-Glutammina (Glutammina 200 mM, EuroClone S.p.A);
- 1% v/v di NEAA (Aminoacidi non essenziali, soluzione 100X, EuroClone S.p.A);
- 1% v/v di soluzione di Penicillina/Streptomicina (Penicillina 10000 U/mL e Streptomicina 10 mg/mL; EuroClone S.p.A);
- 1% v/v di Sodio Piruvato (soluzione 100 mM, EuroClone S.p.A).

Tutte le manipolazioni cellulari sono state eseguite in condizioni di sterilità, all'interno di una cappa a flusso laminare verticale di classe II. Il mezzo di coltura è stato sostituito ogni due giorni per garantire un adeguato apporto di nutrienti e rimuovere prodotti di scarto metabolico. Il cambio del terreno è stato eseguito aspirando il mezzo esausto con una pipetta Pasteur sterile ed aggiungendo 10 mL di terreno preriscaldato a 37°C.

La linea cellulare HepG2 presenta un tempo di duplicazione stimato di circa 24–36 ore, variabile in funzione delle condizioni di coltura. Una volta raggiunta la confluenza cellulare tra il 70% e il 90%, si procede allo splittaggio seguendo il seguente protocollo:

1. Aspirazione del mezzo di coltura e lavaggio delicato dello strato cellulare con 10 mL di PBS sterile (tampone fosfato salino; Sigma-Aldrich), per rimuovere residui di siero che potrebbero inibire l'attività enzimatica della tripsina.
2. Aggiunta di 2 mL di tripsina-EDTA 1X (EuroClone S.p.A), seguita da incubazione a 37°C per 3–5 minuti, per favorire il distacco delle cellule dalla superficie grazie all'azione proteolitica della tripsina, potenziata dall'effetto chelante dell'EDTA.
3. Una volta osservato al microscopio il completo distacco delle cellule, si procede all'inattivazione della tripsina tramite aggiunta di 4 mL di DMEM contenente 10% FBS.
4. La sospensione cellulare viene omogeneizzata mediante pipettaggio ripetuto, per garantire un completo distacco e recupero delle cellule aderenti alle pareti della piastra.
5. Dai 6 mL totali di sospensione ottenuta, se ne preleva un'aliquota opportuna (solitamente 1:3 o 1:5, in base al grado di confluenza e allo scopo sperimentale) e si trasferisce in una nuova piastra contenente 10 mL di nuovo terreno DMEM.
6. La nuova coltura è posta in incubatore alle condizioni standard precedentemente descritte.

### 3.1 Semina cellulare

Lo step iniziale di ogni esperimento in coltura cellulare prevede la semina delle cellule, preceduta dalla determinazione della loro densità tramite conta cellulare. Quest'ultima viene eseguita manualmente mediante l'utilizzo della camera di Bürker.

Le cellule vengono dapprima distaccate dal fondo della piastra mediante l'impiego di una soluzione di tripsina-EDTA 1X, come descritto nei metodi precedenti, e successivamente raccolte in una provetta Falcon da 15 mL per procedere alla conta. In base alla percentuale di confluenza osservata al microscopio, si seleziona un appropriato fattore di diluizione per la miscelazione della sospensione cellulare con il colorante Trypan Blue, comunemente in rapporto 1:2 in presenza di bassa confluenza, e 1:4 nei casi di alta densità cellulare.

Il Trypan Blue è un colorante che permette la distinzione tra cellule vitali e non vitali: esso penetra solo nelle cellule con membrana danneggiata, rendendole visibili al microscopio come cellule colorate di blu, mentre le cellule vive appaiono traslucide.

Per la conta manuale, si prepara una provetta da 0,5 mL contenente la miscela cellulare diluita con Trypan Blue, da cui si prelevano 10 µL da inserire nella camera di Bürker. Il conteggio avviene considerando tre dei nove quadranti principali della camera; ciascuno di questi è suddiviso in 16 quadranti minori. Vengono conteggiate solo le cellule vive che risultano traslucide e localizzate all'interno dei quadranti o sui bordi convenzionalmente accettati, superiore e sinistro ad esempio.

I valori ottenuti nei tre quadranti vengono mediati, e tale media viene utilizzata per calcolare la densità cellulare (cell/mL) secondo la seguente formula:

$$\text{Densità cellulare} = \frac{\text{Numero di cellule contate}}{\text{Numero di quadrati considerati}} \times \text{Fattore di diluizione} \times 10^4$$

*Equazione 1 – Calcolo della densità cellulare tramite camera Bürker*

Il fattore  $10^4$  deriva dal volume noto della camera di Bürker, pari a 1/10.000 mL. Una volta nota la densità cellulare della sospensione madre, si procede al calcolo del volume da prelevare per la semina utilizzando la seguente equazione:

$$V = \frac{\text{Densità cellulare voluta}}{\text{Densità cellulare della soluzione madre}}$$

*Equazione 2 – Volume di sospensione cellulare da prelevare per ottenere la densità desiderata.*

Il volume calcolato viene quindi prelevato dalla sospensione e diluito nel volume di terreno appropriato, deciso in base al numero di pozzetti o piastre da seminare.

### 3.2 Vitalità cellulare

Il saggio alla Sulforodamina B (SRB) è una tecnica colorimetrica ampiamente impiegata per la valutazione indiretta della vitalità e della proliferazione cellulare. La Sulforodamina B è un colorante acido anionico appartenente alla classe azoica, dotato di elevata affinità per i residui basici delle proteine cellulari, in particolare le catene laterali di lisina, arginina e istidina. In condizioni fisiologiche il colorante non attraversa la membrana plasmatica; tuttavia, a seguito della fissazione con un agente precipitante, può penetrare e legarsi in maniera stabile alle proteine cellulari, fornendo una misura proporzionale alla biomassa proteica e, indirettamente, al numero di cellule vitali presenti.

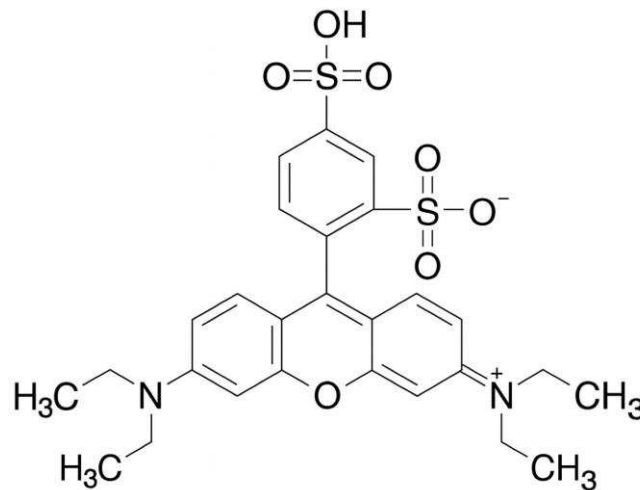


Fig. 38 – Struttura chimica della Sulforodamina B

#### *Semina cellulare*

Le cellule sono state seminate in piastre a 96 pozzetti alla densità di  $8 \times 10^3$  cellule/pozzetto, in un volume di 100  $\mu$ L di terreno DMEM integrato con il 10% di siero fetale bovino. Dopo la semina, le colture sono state incubate a 37 °C in atmosfera umidificata con 5% di CO<sub>2</sub> per permettere l'adesione e la stabilizzazione cellulare.

#### *Trattamento farmacologico*

Dopo un periodo di adesione, le cellule sono state sottoposte ad esposizione con il farmaco Inclisiran a concentrazioni crescenti, partendo da 0,625  $\mu\text{M}$  e raddoppiando progressivamente la concentrazione fino a 40  $\mu\text{M}$ . Il farmaco è stato diluito partendo da una soluzione madre a concentrazione di 284 mg in 1,5 mL di soluzione.

L'incubazione prosegue per 48 ore a 37 °C, in atmosfera controllata al 5% di CO<sub>2</sub>, tempo sufficiente per osservare eventuali effetti citotossici o citostatici indotti dal trattamento.

Il protocollo standard del saggio SRB prevede cinque fasi principali:

1. Aggiunta di 50  $\mu\text{L}$  di acido tricloroacetico (TCA) al 10% p/v a 4 °C per 1 ora al fine di far precipitare e immobilizzare le proteine cellulari. A seguire, rimozione del TCA con acqua distillata.
2. Incubazione con 50  $\mu\text{L}$  di Sulforodamina B (0,4% p/v in acido acetico al 1%) a temperatura ambiente per 1 ora.
3. Lavaggi con 100  $\mu\text{L}$  di acido acetico al 1% per rimuovere il colorante in eccesso.
4. Aggiunta di 150  $\mu\text{L}$  di Tris base (10 mM, pH ~10,5) per staccare il colorante dalle proteine.
5. Misurazione dell'assorbanza a 520 nm per valutare la massa proteica totale tramite lettore di micropiastre Mithras LB 940 (Berthold Technologies).

### ***3.3 Analisi dell'espressione proteica mediante Western Blotting***

Il Western Blotting è una tecnica immunochimica qualitativa largamente impiegata per la rilevazione e la quantificazione relativa di specifiche proteine in campioni biologici complessi. Si basa sul riconoscimento selettivo tra un anticorpo e l'antigene di interesse, consentendo di valutare la presenza ed il livello di espressione della proteina target in un estratto cellulare<sup>65</sup>.

Il protocollo standard prevede sei fasi principali:

1. Preparazione del campione tramite estrazione delle proteine totali e successiva quantificazione.
2. Separazione elettroforetica delle proteine mediante SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).
3. Trasferimento su membrana (nitrocellulosa o PVDF) delle proteine separate e blocco dei siti aspecifici.
4. Incubazione con anticorpo primario, specifico per la proteina d'interesse.
5. Incubazione con anticorpo secondario, coniugato con enzimi rilevabili (es. perossidasi di rafano, HRP).
6. Rivelazione del segnale tramite chemiluminescenza (ECL, Enhanced Chemiluminescence).

#### *Semina e trattamento cellulare*

Per lo svolgimento degli esperimenti, le cellule sono state seminate in piastre Petri da 60 mm, con concentrazioni 1 milione di cellule per pozzetto, utilizzando terreno DMEM supplementato con 10% FBS.

Dopo 24 ore dalla semina, il mezzo di coltura è stato rimosso e le cellule lavate con PBS sterile (Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich), al fine di eliminare eventuali residui sierici. A seguire, le cellule sono state trattate con:

1. Dosi crescenti di Inclisiran (0,625  $\mu$ M, 1,25  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M) per 48 ore. L'esperimento è stato condotto al fine di valutare

l'effetto del trattamento sui livelli di espressione proteica di PCSK9 e LDLR.

2. Dose costante a 5  $\mu$ M di Inclisiran per diverse tempistiche di esposizione (1h, 2h, 4h, 8h, 24h), con l'obiettivo di analizzare la cinetica d'azione del farmaco e monitorare le variazioni nell'espressione proteica di PCSK9 e LDLR.

Al termine dei rispettivi trattamenti, le cellule sono state sottoposte a lisi per l'estrazione delle proteine totali. Tutte le operazioni sono condotte su ghiaccio per ridurre la degradazione proteica. Il mezzo è stato aspirato e le cellule lavate due volte con PBS freddo, allo scopo di rimuovere eventuali residui di albumina che avrebbero potuto interferire con la quantificazione proteica. Successivamente, in ciascun pozzetto sono stati aggiunti 250  $\mu$ L di buffer di lisi, seguito dal distacco meccanico delle cellule tramite cell scraper.

La soluzione di buffer di lisi (40 mL) è costituita da:

- NaCl 150 mM;
- 1200  $\mu$ L Inibitore delle fosfatasi 100x;
- 400  $\mu$ L Inibitore delle proteasi 100x;
- 400  $\mu$ L Tris 50 mM;
- 2 mL Nonidet p40 0.5%;
- 100  $\mu$ L Acqua milli-Q q.b. a 40 mL.

Il contenuto di ogni pozzetto è stato trasferito in microprovette pre-etichettate e lasciato in ghiaccio per 30 minuti. Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati centrifugati a 15.000 rpm per 10 minuti a 4°C ed il surnatante contenente le proteine solubili recuperato e trasferito in nuove provette. Se la quantificazione proteica non avviene il giorno stesso, si procede alla conservazione dei campioni in freezer -20°C.

La determinazione della concentrazione proteica viene eseguita tramite il saggio BCA (Bicinchoninic Acid Assay), metodo colorimetrico sensibile e compatibile con la maggior parte dei reagenti presenti nel buffer di lisi.

*Quantificazione proteica mediante saggio dell'acido bicinconinico (BCA)*

La quantificazione della concentrazione proteica totale di un campione è un passaggio fondamentale nelle fasi preparative di molte tecniche bioanalitiche, tra cui Western Blotting ed ELISA. Il saggio dell'acido bicinconinico (BCA) è una delle metodiche colorimetriche più comunemente utilizzate a tale scopo, grazie alla sua sensibilità, riproducibilità e compatibilità con numerosi agenti detergenti e tamponi<sup>66</sup>.

Nel contesto del Western Blotting, il saggio BCA consente di determinare la quantità esatta di proteine presenti in ogni campione, al fine di equalizzare il contenuto proteico da caricare su ciascuna corsia del gel. Questo permette di garantire un caricamento uniforme tra i vari campioni e permettere un confronto accurato dei livelli di espressione proteica.

La reazione alla base del metodo BCA è una reazione temperatura-dipendente che avviene in ambiente alcalino e si articola in due fasi principali. Nella prima fase, i legami peptidici presenti nelle proteine riducono gli ioni rameici ( $\text{Cu}^{2+}$ ), provenienti dal solfato di rame ( $\text{CuSO}_4$ ), a ioni rameosi ( $\text{Cu}^+$ ). Nella seconda fase, ogni ione  $\text{Cu}^+$  formato complessa con due molecole di acido bicinconinico, formando un complesso solubile di colore viola intenso che presenta un picco massimo di assorbimento a una lunghezza d'onda di 562 nm. L'intensità della colorazione è direttamente proporzionale alla concentrazione proteica nel campione analizzato<sup>66</sup>.

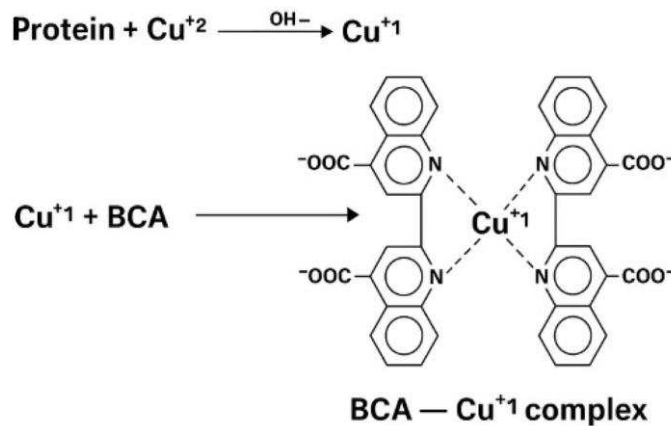


Fig. 39 - Formazione di complesso viola BCA-ione rameoso generato dalla reazione del biuretto

Per l'esecuzione del saggio è stato utilizzato il Bicinchoninic Protein Assay Kit (Serva), costituito da due componenti: la soluzione A, contenente l'acido bicinconinico, e la soluzione B, costituita da solfato di rame ( $\text{CuSO}_4$ ). La soluzione di lavoro è stata preparata mescolando i due reagenti nel rapporto 50:1 (A:B), come indicato dal protocollo fornito dal produttore.

L'esperimento è stato eseguito utilizzando una piastra da 96 pozzetti. In ciascun pozzetto sono stati pipettati 10  $\mu$ L del campione da analizzare e di albumina sierica bovina (BSA, Serva) a concentrazioni note e crescenti, utilizzata per costruire la curva standard. Successivamente, sono stati aggiunti 200  $\mu$ L della soluzione di lavoro A+B in ciascun pozzetto.

La piastra è stata incubata a 37°C per 30 minuti per consentire lo sviluppo completo della colorazione. Al termine dell'incubazione, l'assorbanza di ciascun pozzetto è stata misurata tramite spettrofotometria a 570 nm utilizzando un lettore per micropiastre multimodale Victor Nivo Multimode Microplate Reader (PerkinElmer). I valori di assorbanza ottenuti sono stati infine confrontati con la curva standard per determinare la concentrazione proteica nei campioni incogniti.

#### *Preparazione dei campioni per SDS-PAGE*

Dopo la lisi cellulare e la quantificazione delle proteine, i campioni sono stati normalizzati in base alla concentrazione più bassa rilevata, mediante opportuna diluizione con buffer di lisi. A ciascun campione è stato quindi aggiunto in pari volume il Loading Buffer, un tampone di caricamento che consente la denaturazione ed il corretto deposito del campione nei pozzetti del gel.

Il Loading Buffer 4X è costituito dai seguenti componenti:

- Glicerolo: 8,88 mL;
- $\beta$ -mercaptoetanolo: 1,8 mL;
- SDS (Sodio Dodecil Solfato): 0,88 g;
- Blu di bromofenolo: 0,004 g;
- Tris 2 M: 2,78 mL;
- Acqua Milli-Q: q.b. a 18 mL.

I campioni così preparati sono stati incubati a 95°C per 5 minuti in termoblocco, al fine di completare la denaturazione proteica e la loro stabilizzazione. Al termine, i campioni sono stati conservati su ghiaccio o caricati direttamente sui gel per l'elettroforesi.

*Elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)*

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE) è una tecnica analitica ampiamente utilizzata per separare le proteine in base a dimensione, carica e conformazione tridimensionale. In questo studio è stata impiegata la versione denaturante, nota come SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PAGE), in cui la separazione avviene in funzione esclusivamente del peso molecolare delle proteine<sup>67</sup>.

L'SDS, un tensioattivo anionico, si lega alle catene polipeptidiche in un rapporto approssimativamente costante di 1,4 g per grammo di proteina, conferendo loro una carica negativa uniforme proporzionale alla lunghezza della catena e denaturandone la struttura terziaria e quaternaria. In questo modo, le differenze di migrazione dovute alla forma o alla carica intrinseca delle proteine vengono annullate, consentendo una separazione basata unicamente sulla dimensione<sup>67</sup>.

Nel presente studio è stato utilizzato un gel di poliacrilammide a gradiente di concentrazione compreso tra il 4% e il 20% (Mini-PROTEAN® TGX™ gel, Bio-Rad), in cui le proteine migrano dall'alto verso il basso sotto l'azione di un campo elettrico. L'aumento della concentrazione di poliacrilammide lungo il gel riduce progressivamente le dimensioni delle maglie della rete polimerica, generando un effetto di setaccio molecolare: le proteine di dimensioni ridotte riescono a migrare più rapidamente verso la parte inferiore del gel, mentre quelle di dimensioni maggiori subiscono una migrazione più lenta e rimangono nella porzione superiore.

Il gel di poliacrilammide è costituito da due porzioni distinte: lo stacking gel e il resolving gel. Entrambi contengono gli stessi componenti di base, ma differiscono per concentrazione di poliacrilammide e pH, con ruoli differenti nella separazione elettroforetica:

- Stacking gel (gel di impaccamento): situato nella porzione superiore, presenta una concentrazione costante di poliacrilammide pari al 4% e un pH di 6,8. In queste condizioni la glicina, prevalentemente neutra, migra più lentamente, creando una zona a bassa conducibilità ionica che provoca l'accumulo e l'allineamento delle

proteine in un fronte compatto, ottimizzando la risoluzione nella fase di separazione.

- Resolving gel (gel di separazione): situato nella porzione inferiore, presenta una concentrazione crescente di poliacrilammide e un pH di 8,8. A questo pH la glicina è ionizzata (glicinato), eliminando l'effetto di rallentamento presente nello stacking gel. In queste condizioni le proteine, già uniformemente cariche grazie all'SDS, migrano esclusivamente in base alle loro dimensioni attraverso le maglie della rete polimerica.

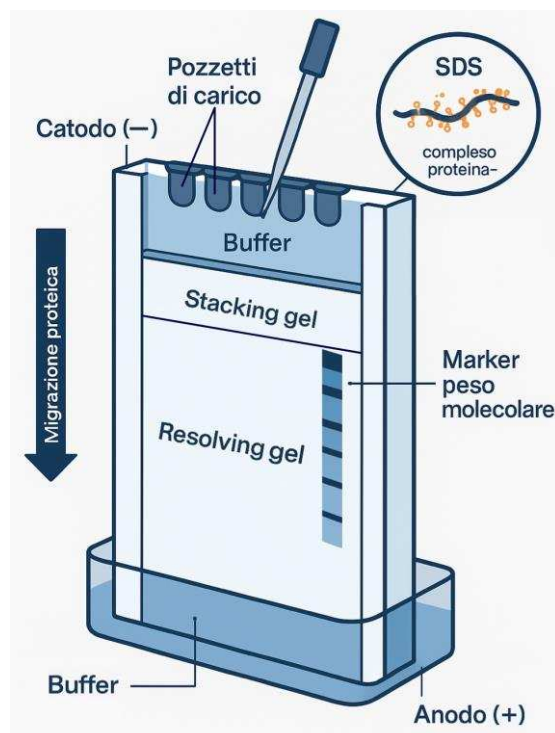


Fig. 40 - Schema dell'elettroforesi SDS-Page

Il gel viene montato all'interno di una cella elettroforetica verticale (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad). Nei pozzetti può essere caricato un volume non superiore ai 50  $\mu\text{L}$  di materiale proteico, che deve contenere almeno 20  $\mu\text{g}$  di proteine totali per consentire una visualizzazione ottimale. Nei pozzetti laterali vengono caricati 5  $\mu\text{L}$  di marker di peso molecolare SHARPMASS VI, EuroClone S.p.A., contenente una miscela di proteine a peso noto, utile per identificare la banda corrispondente alla proteina di interesse.

La separazione avviene in presenza di running buffer, applicando un voltaggio costante di 120 V per un tempo sufficiente a completare la migrazione.

Composizione del Running Buffer 10X (1L):

- Tris base: 15,14 g;
- Glicina: 72,0 g;
- SDS: 5,0 g;
- Acqua Milli-Q: q.b. fino a 1 L.

Il running buffer deve essere diluito alla concentrazione 1X immediatamente prima dell'uso tramite aggiunta di acqua milliQ fredda. La presenza di SDS nel tampone è fondamentale per mantenere la denaturazione delle proteine e preservare la carica negativa uniforme durante l'intera corsa elettroforetica, assicurando che la separazione avvenga esclusivamente in base alla dimensione molecolare.

#### *Trasferimento delle proteine su membrana*

Dopo la separazione elettroforetica su gel di poliacrilammide, le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo<sup>™</sup> Mini 0.2  $\mu$ m Nitrocellulose Transfer Packs, Bio-Rad) utilizzando un sistema di electrotransfer (Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo<sup>™</sup> Transfer System, Bio-Rad). Nel presente protocollo, il trasferimento è stato effettuato applicando una tensione costante di 25 V per 30 minuti.

Il trasferimento dal gel alla membrana avviene tramite un sistema preassemblato fornito nel kit commerciale. Il Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo<sup>™</sup> Transfer Pack, Midi Format, 0.2  $\mu$ m Nitrocellulose, Bio-Rad è costituito da un gel di poliacrilammide collocato sopra una membrana e interposto tra tre strati di carta da filtro precedentemente saturata con tampone di trasferimento. Considerando che, sotto l'azione del campo elettrico, le proteine migrano dal catodo (-) verso l'anodo (+), la membrana deve essere posizionata tra il gel e l'anodo (+) per consentire il corretto trasferimento.

Prima di procedere, è essenziale eliminare accuratamente eventuali bolle d'aria tra gel e membrana tramite un rullo, poiché queste possono ostacolare il contatto e compromettere l'efficienza del trasferimento.

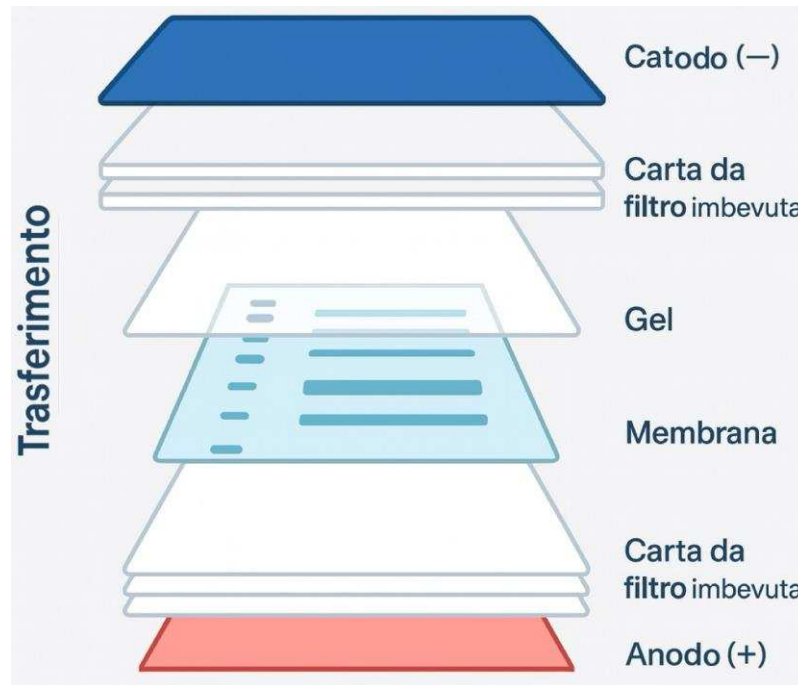


Fig. 41 – illustrazione di un trans-Blot di trasferimento

L'elettrotrasferimento garantisce un passaggio rapido ed efficiente delle proteine grazie alla differenza di potenziale applicata, consentendo di ottenere una riproduzione fedele del pattern di separazione osservato nel gel, ma immobilizzato su una superficie idonea alle successive fasi di immunorivelazione.

#### *Bloccaggio e trattamento con anticorpi*

Dopo il trasferimento delle proteine sulla membrana di nitrocellulosa, questa deve essere sottoposta a bloccaggio al fine di saturare i siti di legame aspecifici. Il blocco viene effettuato incubando la membrana in una soluzione di latte scremato al 5% p/V disciolto in TBST20 1X (Tris-Buffered Saline con 0,1% Tween 20), preparato per diluizione a partire da TBST20 10X.

Per la preparazione di TBST20 10X (1 L):

- NaCl: 87,5 g;
- Tween 20: 10 mL;
- Tris: 6 g;
- Acqua Milli-Q q.b. a 1 L.

Il bloccaggio è stato condotto a temperatura ambiente per 1 ora, con agitazione costante a 70 rpm. Il latte scremato, privo di lipidi, è ricco di caseine e albumina bovina (BSA), le quali si legano con alta affinità alla membrana, occupando in maniera uniforme le aree prive di proteine trasferite. Queste proteine da blocco non interagiscono con l'antigene di interesse, poiché un legame non specifico ne impedirebbe il riconoscimento da parte dell'anticorpo.

Successivamente, la membrana è stata incubata con la soluzione contenente l'anticorpo primario, preparata diluendo l'anticorpo nella stessa soluzione di bloccaggio in quantità sufficiente a ricoprire completamente la membrana. La diluizione tipica è 1:1000, salvo diversa indicazione. L'incubazione avviene overnight a 4 °C, in agitazione continua.

Target	Marca	Codice	Clonalità	Ospite	Diluizione
LDLR	Genetex	GTX132860	Policlonale	Coniglio	1:1000
PCSK9	ABclonal	A21909	Monoclonale	Coniglio	1:1000
GAPDH	Genetex	GTX100118	Policlonale	Coniglio	1:5000
Anticorpo secondario (HRP anti-Rabbit)	Jackson ImmunoResearch	111-545-003	Policlonale	Capra	1:5000

Tabella 4. – Anticorpi primari utilizzati per il Western Blot

Il giorno seguente, l'anticorpo primario viene recuperato e la membrana sottoposta a tre lavaggi di 15 minuti ciascuno in TBST20 1X, per rimuovere l'anticorpo non legato al bersaglio.

Segue l'incubazione con l'anticorpo secondario, specifico per la frazione costante (Fc) dell'anticorpo primario e coniugato con perossidasi di rafano (HRP). Questa reazione dura 90 minuti a temperatura ambiente, in agitazione costante.

La HRP catalizza la dismutazione del perossido di idrogeno in ossigeno e acqua, utilizzando il luminolo come substrato. In ambiente alcalino, il luminolo (presente come

dianione) subisce un riarrangiamento elettronico, reagisce con l'ossigeno e libera azoto molecolare, spostando l'equilibrio della reazione. Il prodotto instabile emette radiazione luminosa a 425 nm, fenomeno noto come chemiluminescenza<sup>68</sup>.

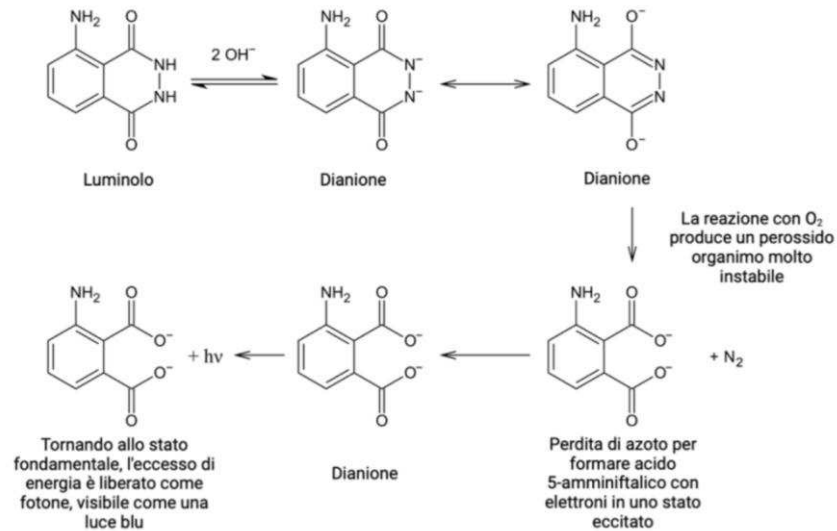


Fig. 42 - Reazione di chemiluminescenza con ossidazione del luminolo mediata dalla HRP.

Dopo l'incubazione, la membrana viene lavata tre volte per 15 minuti in TBST20 1X. Successivamente, si applica in modo uniforme la soluzione ECL (Clarity™ Western Enhanced Chemiluminescence Substrate kit – Bio-Rad), costituita da volumi uguali di luminolo e perossido di idrogeno.

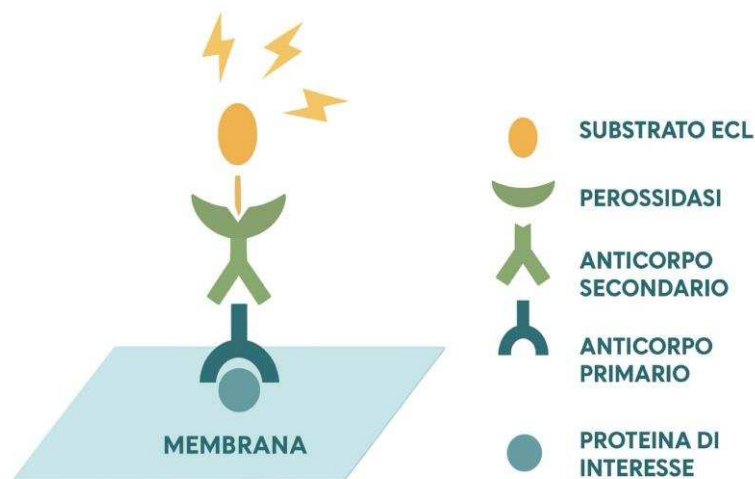


Fig. 43 - Presentazione schematica del rilevamento di proteine sulla membrana western blot mediante ECL.

L'acquisizione del segnale è stata effettuata tramite sistema di imaging Uvitec Alliance Q9 Atom (Cambridge, UK) e l'analisi densitometrica con il software Image Lab™ v6.0.1 (Bio-Rad), che misura la densità di pixel delle bande proteiche rilevate.

### *Strippaggio della membrana*

Lo stripping consente di rimuovere gli anticorpi primari legati alla membrana, permettendo di riutilizzarla per la rilevazione di altre proteine bersaglio.

Il procedimento prevede due lavaggi di 10 minuti ciascuno con Stripping Buffer, seguito da due lavaggi di 10 minuti in PBS e due lavaggi di 5 minuti in TBST20 1X.

Per la preparazione di 1 L di Stripping Buffer:

- Tween 20: 20 mL;
- Glicina: 30 g;
- SDS: 2 g;
- HCl: q.b. per portare a pH 2,2;
- Acqua Milli-Q q.b. a 1 L.

Al termine, si esegue nuovamente il bloccaggio con latte scremato al 5% per 90 minuti a temperatura ambiente, in agitazione continua, seguito dall'incubazione con il nuovo anticorpo primario e secondario secondo la procedura precedentemente descritta.

### 3.4 Analisi quantitativa mediante PCR

La Polymerase Chain Reaction (PCR), o reazione a catena della polimerasi, è una tecnica di biologia molecolare che consente l'amplificazione specifica di acidi nucleici, permettendo la sintesi di un determinato segmento di DNA a partire da un filamento stampo. Nella sua variante quantitativa in tempo reale (quantitative real-time PCR, qPCR), l'amplificazione del DNA viene monitorata in ogni ciclo mediante l'impiego di molecole fluorescenti, la cui intensità di emissione è proporzionale alla concentrazione del prodotto di reazione<sup>69</sup>.

L'andamento della fluorescenza viene registrato durante i cicli di amplificazione e consente di determinare il *threshold cycle* (Ct), ossia il numero di cicli necessari affinché il segnale fluorescente superi la fluorescenza di fondo. Il valore di Ct è inversamente proporzionale alla quantità iniziale di DNA bersaglio: quanto maggiore è la concentrazione di sequenza target nel campione di partenza, tanto più basso sarà il Ct registrato.

Ciascun ciclo di PCR si articola in tre fasi principali:

1. *Denaturazione*: Avviene a circa 95 °C e comporta la separazione dei due filamenti della doppia elica di DNA stampo. Questa fase garantisce l'accessibilità delle sequenze target ai primer e inattiva eventuali proteasi o nucleasi termolabili presenti nel campione, favorendo un'amplificazione efficiente fin dal primo ciclo<sup>69</sup>.
2. *Annealing*: La temperatura viene abbassata ad un intervallo compreso tra 55 e 70 °C, consentendo l'ibridazione dei primer forward e reverse alle sequenze complementari presenti sui filamenti opposti del DNA bersaglio. I primer, lunghi tipicamente 20–25 nucleotidi, vengono progettati in base alla sequenza del DNA stampo, assicurando specificità e selettività di amplificazione<sup>69</sup>.
3. *Allungamento*: Un incremento della temperatura a 70–75 °C permette alla DNA polimerasi di estendere i primer, incorporando i deossiribonucleotiditriposfati (dNTPs) complementari alla sequenza stampo. In questa fase, quando si utilizza la molecola intercalante SYBR Green I, la molecola si inserisce nel solco minore del DNA a doppio filamento. Il complesso DNA–SYBR Green assorbe luce a 488 nm ed emette fluorescenza a 522 nm; tale segnale, misurato alla fine di ciascun ciclo, è direttamente proporzionale alla quantità di DNA amplificato<sup>69</sup>.

Il ciclo *denaturazione–annealing–allungamento* viene ripetuto per circa 40 volte all'interno di un termociclatore, dispositivo programmabile che controlla con precisione tempi e temperature di ogni fase. Negli ultimi cicli la reazione tende a rallentare a causa del consumo dei reagenti e della riduzione dell'attività enzimatica della polimerasi, fino all'arresto dell'amplificazione.

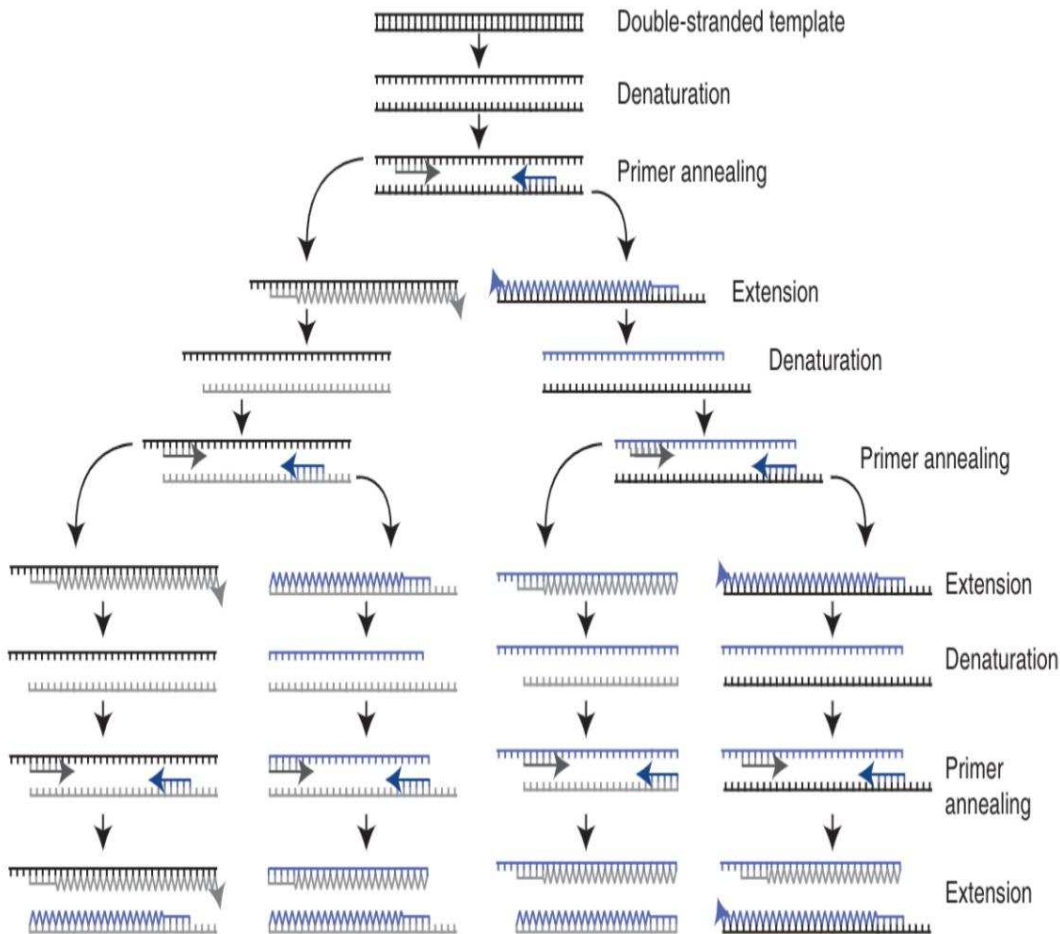


Fig. 44 – Schema semplificato dei cicli di amplificazione in qPCR.

Per la quantificazione relativa dell'espressione genica, il valore di Ct ottenuto per il gene di interesse viene normalizzato rispetto a un gene di riferimento, comunemente un *housekeeping gene*. In questo lavoro è stato impiegato l'RNA ribosomiale 18S, codificante per la subunità ribosomiale 18S, caratterizzato da un'elevata e costante espressione in diversi tipi cellulari e non influenzato dal trattamento sperimentale.

L'analisi quantitativa mediante qPCR prevede tipicamente le seguenti fasi operative:

- semina cellulare;
- trattamento farmacologico o sperimentale;

- estrazione e preparazione degli acidi nucleici;
- l'analisi quantitativa vera e propria.

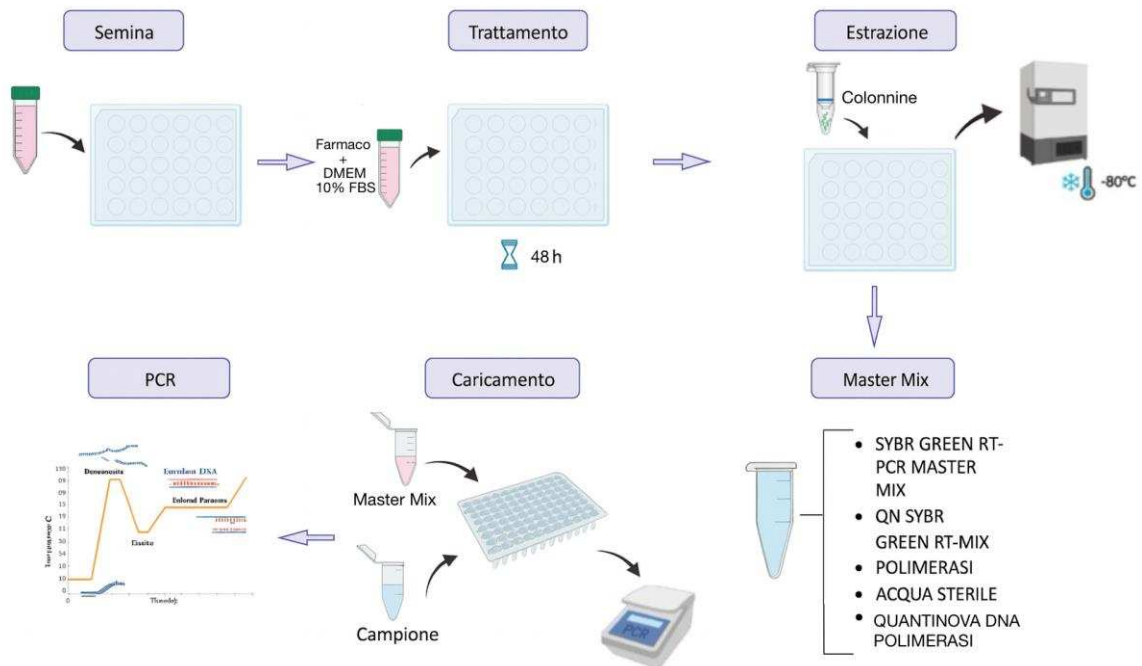


Fig. 45 - Schema riassuntivo delle diverse fasi di esecuzione dell'analisi tramite RT-qPCR.

### Semina e trattamento cellulare

Un milione di cellule HepG2 sono state seminate in piastre Petri da 6 pozzetti, con 2 mL di terreno DMEM integrato con il 10% di FBS per pozzetto. Dopo un'incubazione iniziale di 24 ore a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, si è proceduto dall'aggiunta del farmaco in studio.

### Preparazione dei campioni

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp., Cat. n. 17200), seguendo il protocollo standard fornito dal produttore. Dopo la rimozione del mezzo di coltura, le cellule sono state lavate due volte con 2 mL di PBS per rimuovere eventuali residui di siero e metaboliti. Successivamente, sono state sottoposte a lisi mediante l'aggiunta del Buffer RL fornito nel kit. La sospensione cellulare lisata è stata trasferita all'interno delle Mini Column in silice, già assemblate nei rispettivi *collection tube*, insieme a 200 µL di etanolo al 96% preparati dall'operatore. Questa fase è seguita da

centrifugazione per 3 minuti a 14.000 rpm, che permette il legame selettivo dell'RNA alla matrice della colonna e la rimozione del DNA genomico, prevenendo così contaminazioni durante le analisi a valle.

Alla colonna può essere quindi aggiunta la *Wash Solution A* fornita dal kit; la centrifugazione è stata eseguita per 3 minuti a 14.000 rpm e la fase di lavaggio ripetuta per un totale di tre volte, al fine di eliminare impurità proteiche e residui di reagenti. Segue una centrifugazione aggiuntiva a colonna vuota, sempre per 3 minuti a 14.000 rpm, per asciugare completamente la matrice filtrante e rimuovere eventuali tracce di solvente.

Terminati i lavaggi, la Mini Colonna è stata trasferita in *elution tube* sterili e precedentemente siglati. Sono stati quindi aggiunti 50 µL di Elution Solution forniti nel kit, e si è proceduto ad una centrifugazione di 3 minuti a 2000 rpm, seguita da ulteriori 3 minuti a 14.000 rpm. Al termine, la soluzione presente sul fondo dell'*elution tube*, contenente l'RNA purificato, può essere raccolta e conservata a temperatura adeguata per le successive analisi, mentre la colonna esausta viene eliminata.

Tutte le fasi della procedura vengono condotte in condizioni RNasi-free, utilizzando materiale sterile e guanti monouso, al fine di prevenire la degradazione del materiale genetico.

Al fine di uniformare la concentrazione del target genetico ed assicurare la comparabilità tra campioni, le soluzioni ottenute sono state analizzate mediante NanoDrop™ 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific). Lo strumento fornisce sia la concentrazione di RNA espressa in ng/µL sia gli indici di purezza, calcolati come rapporto A260/A280 e A260/A230. Un rapporto A260/A280 compreso tra 1,8 e 2,1 è stato considerato indicativo di un'elevata purezza dell'RNA, mentre valori inferiori suggerivano una possibile contaminazione proteica o da fenolo.

Sulla base delle concentrazioni rilevate, sono state effettuate opportune diluizioni per portare tutti i campioni ad una densità di materiale genetico uniforme, idonea alla fase successiva, utilizzando l'acqua *DNasi/RNasi free* fornita nel kit di estrazione.

Per la fase di retrotrascrizione ed amplificazione in tempo reale è stata allestita una Master Mix contenente tutti i componenti necessari alla reazione. Per ogni reazione, corrispondente

ad un singolo pozzetto della piastra PCR, sono stati utilizzati 9  $\mu\text{L}$  di Master Mix e 1  $\mu\text{L}$  di campione di mRNA estratto, per un totale di 100  $\mu\text{L}$ . La composizione della Master Mix, calcolata per un volume di 9  $\mu\text{L}$ , è la seguente:

- 5  $\mu\text{L}$  di SYBR Green RT-PCR Master Mix;
- 1  $\mu\text{L}$  di Primer Mix 5  $\mu\text{M}$ , preparato solubilizzando in 90  $\mu\text{L}$  di acqua RNasi-free;
- 2,9  $\mu\text{L}$  di acqua RNasi-free;
- 0,1  $\mu\text{L}$  di QN SYBR Green RT-Mix.

Il pipettaggio deve essere eseguito con attenzione per evitare la formazione di bolle d'aria e garantire un'omogenea distribuzione dei reagenti. I campioni sono stati inseriti in piastre da 96 pozzetti e ogni condizione sperimentale è stata testata in triplicato tecnico, al fine di garantire la riproducibilità e l'affidabilità dei dati.

I Primer Mix utilizzati sono specifici per i seguenti mRNA bersaglio:

- 18S
  - Primer forward (5'→3'): CGGCTACCACATCCACGGAA
  - Primer reverse (3'→5'): CCTGAATTGTTATTTTTCGTCACTACC
- LDLR
  - Primer forward (5'→3'): TCTATGGAAGAACTGGCGGC
  - Primer reverse (3'→5'): ACCATCTGTCTCGAGGGGTA
- PCSK9
  - Primer forward (5'→3'): CCTGCGCGTGCTCAACT
  - Primer reverse (3'→5'): GCTGGCTTTTCCGAATAAACTC

#### *Analisi mediante qPCR*

La piastra è stata sigillata con film ottico per prevenire evaporazioni e contaminazioni, quindi centrifugata per 1 minuto a 1100 rpm, in modo da favorire la sedimentazione del contenuto e garantire un volume uniforme in ciascun pozzetto.

Le reazioni di retrotrascrizione ed amplificazione sono eseguite utilizzando il sistema CFX96 Real-Time PCR Detection System - C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad), impostato con il seguente programma termico:

1. Retrotrascrizione: 50 °C per 10 minuti
2. Attivazione iniziale / denaturazione: 95 °C per 2 minuti
3. Cicli di amplificazione (×39)
  - Denaturazione: 95 °C per 5 secondi
  - Annealing/Estensione: 60 °C per 10 secondi
4. Analisi di melting curve
  - Step iniziale: 65 °C per 5 secondi
  - Incremento di temperatura: 0,5 °C/ciclo fino a 95 °C

Al termine della corsa, lo strumento genera i valori di  $C_t$ , che rappresentano il numero di cicli necessari affinché il segnale di fluorescenza superi la soglia di rilevamento preimpostata. Il valore di  $C_t$  è inversamente proporzionale alla quantità di trascritto presente nel campione: concentrazioni più elevate di mRNA comportano valori di  $C_t$  più bassi.

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il software Bio-Rad CFX Manager™, che consente la normalizzazione dei valori rispetto ai trascritti housekeeping, l'elaborazione dei dati in analisi quantitativa relativa e la loro successiva interpretazione.

### **3.5 Quantificazione delle proteine secrete tramite saggio ELISA**

La quantificazione della proteina PCSK9, secreta nel terreno di coltura dalle cellule HepG2, è stata effettuata mediante un saggio immunoenzimatico di tipo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Nel saggio sandwich ELISA, un anticorpo di cattura specifico per PCSK9 viene immobilizzato sul fondo dei pozzetti di una piastra a 96 pozzetti. Successivamente, il campione contenente la proteina di interesse (in questo caso il surnatante di coltura delle cellule HepG2) viene aggiunto ai pozzetti, permettendo al PCSK9 di legarsi all'anticorpo fissato. Un anticorpo di rivelazione, diretto verso un epitopo distinto della stessa proteina, viene poi aggiunto per formare il complesso "sandwich" anticorpo-antigene-anticorpo.

Questo secondo anticorpo è biotinilato e viene successivamente riconosciuto da una streptavidina coniugata a perossidasi di rafano. In presenza del substrato cromogenico TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), l'enzima catalizza una reazione colorimetrica che genera un prodotto di colore blu, convertito in giallo dall'aggiunta della soluzione di stop acida. L'intensità del colore, misurata come densità ottica, è proporzionale alla concentrazione di PCSK9 nel campione.

La quantificazione avviene interpolando i valori di densità ottica dei campioni sulla curva standard costruita con concentrazioni note di PCSK9.

#### *Preparazione della piastra*

1. Rivestimento della piastra: l'anticorpo di cattura anti-PCSK9 è stato diluito alla concentrazione di lavoro in tampone PBS fornito dal kit. Successivamente, 100  $\mu$ L della soluzione sono stati dispensati nei pozzetti necessari, di una piastra da 96 pozzetti. La piastra è stata sigillata e incubata overnight a temperatura ambiente per consentire l'adsorbimento dell'anticorpo alla superficie del pozzetto.
2. Lavaggi: dopo l'incubazione, la soluzione è stata aspirata e i pozzetti sono stati lavati tre volte con Wash Buffer (20 mL di *Wash Buffer* Concentrato in 480 mL di acqua Milli-Q), aggiungendo 300  $\mu$ L per pozzetto e assicurando la completa rimozione del liquido residuo dopo ogni lavaggio.

3. Blocco: per saturare i siti non specifici di legame sulla superficie della piastra, sono stati aggiunti 300  $\mu\text{L}$  di *Reagent Diluent* (diluizione 1:10 con acqua Milli-Q). La piastra è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente e successivamente lavata come descritto nel passaggio precedente.

*Legame con l'anticorpo e rivelazione*

1. Aggiunta dei campioni e degli standard: in ciascun pozzetto sono stati aggiunti 100  $\mu\text{L}$  di scala standard di PCSK9 a concentrazioni note, necessaria per ottenere la curva di calibrazione, ed il surnatante di coltura diluito 1:4 in *Reagent Diluent*. La piastra è stata coperta con pellicola adesiva e incubata per 2 ore a temperatura ambiente, consentendo il legame del PCSK9 all'anticorpo di cattura.
2. Lavaggio: terminata l'incubazione, la piastra è stata lavata come precedentemente descritto.
3. Aggiunta dell'anticorpo di rivelazione: sono stati aggiunti 100  $\mu\text{L}$  di anticorpo di rivelazione anti-PCSK9, diluito 1:180 in *Reagent Diluent*. La piastra è stata incubata per 2 ore a temperatura ambiente, evitando l'esposizione diretta alla luce.
4. Lavaggio: la piastra è stata nuovamente sottoposta a lavaggi multipli con Wash Buffer.
5. Aggiunta dello Streptavidin–HRP: è stata quindi aggiunta la soluzione di Streptavidina–HRP (100  $\mu\text{L}$  per pozzetto), diluita 1:200 con *Reagent Diluent*, alla concentrazione di lavoro. La piastra è stata incubata per 20 minuti a temperatura ambiente.
6. Lavaggio: la piastra è stata nuovamente sottoposta a lavaggi multipli con *Wash Buffer*.
7. Aggiunta del substrato cromogenico: in ogni pozzetto sono stati aggiunti 100  $\mu\text{L}$  di *Substrate Solution* (TMB) e la piastra è stata incubata per 20 minuti a temperatura ambiente, evitando l'esposizione alla luce diretta.
8. Arresto della reazione: la reazione enzimatica è stata bloccata aggiungendo 50  $\mu\text{L}$  di *Stop Solution* in ciascun pozzetto, determinando il viraggio del colore da blu a giallo.

9. Lettura spettrofotometrica: l'assorbanza è stata misurata a 450 nm mediante lettore di micropiastre Mithras LB 940 (Berthold Technologies), con correzione a 570 nm per eliminare il background.

I valori ottenuti sono stati elaborati per la costruzione della curva standard e la successiva determinazione della concentrazione di PCSK9 nei campioni sperimentali.

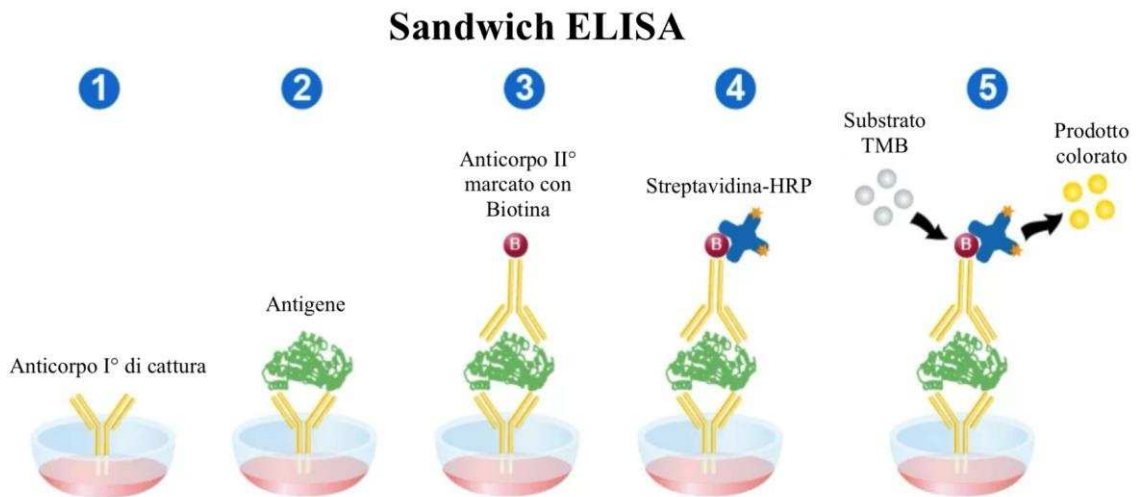


Fig. 46 - Schema illustrativo del principio del saggio Sandwich ELISA.

### ***3.6 Time-course con Inclisiran 5 $\mu$ M***

È stato eseguito un time-course per caratterizzare la dinamica degli effetti di Inclisiran a concentrazione 5  $\mu$ M su trascritti e proteine target. Per le tempistiche selezionate di 1 h, 2 h, 4 h, 8 h e 24 h sono state preparate colture parallele e controlli veicolo corrispondenti, tramite i quali sono state condotte serie sperimentali indipendenti di Western Blot, completate in un primo momento, seguite successivamente da serie sperimentali indipendenti di RT-qPCR eseguite in condizioni identiche di coltura e trattamento. Le cellule HepG2 sono state mantenute in condizioni standard a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, in DMEM ad alto glucosio integrato con 10% FBS, L-glutamina, NEAA, penicillina/streptomina e sodio piruvato. Tutte le manipolazioni sono state condotte in sterilità in cappa a flusso laminare.

#### *Preparazione delle colture e trattamento*

La linea cellulare HepG2 è stata seminata nei formati sperimentali già descritti nelle sezioni precedenti, in modo da garantire la comparabilità dei risultati. Dopo il periodo di adesione, il trattamento con Inclisiran 5  $\mu$ M è stato avviato in tempi sfalsati seguendo l'ordine di 24 h, 8 h, 4 h, 2 h e 1 h, così da consentire l'interruzione simultanea di tutte le condizioni sperimentali e ridurre la variabilità dovuta a differenze di manipolazione o di esposizione. In parallelo, per ciascun tempo di trattamento, sono state mantenute colture di controllo veicolo, sottoposte alle stesse condizioni di incubazione ma prive del principio attivo, al fine di fornire un riferimento diretto per l'analisi dei dati.

### ***3.7 Combinazione Inclisiran + Simvastatina***

Le analisi sono state condotte sulla linea cellulare umana di epatocarcinoma HepG2, dove le procedure di semina e i formati di piastra impiegati sono rimasti invariati rispetto ai saggi precedenti

#### *Trattamenti farmacologici*

Dopo 24 ore dalla semina, le cellule sono state trattate con:

- Inclisiran a 2,5  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$
- Simvastatina a 10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$

I farmaci sono stati somministrati sia singolarmente sia in cosomministrazione (2,5  $\mu\text{M}$  o 5  $\mu\text{M}$  di Inclisiran combinati con 10  $\mu\text{M}$  o 20  $\mu\text{M}$  di Simvastatina) e la durata del trattamento è stata di 48 ore, al termine del quale i campioni sono stati processati per RT-qPCR e per Western blotting.



## 4. Risultati

### 4.1 Inclisiran non altera la vitalità cellulare in cellule HepG2

Per escludere effetti citotossici di Inclisiran sulla linea HepG2, è stata eseguita un'analisi di vitalità mediante saggio alla Sulforodamina B dopo 48 ore di esposizione partendo dalla concentrazione di 0,625  $\mu\text{M}$  e raddoppiando la progressivamente fino a 40  $\mu\text{M}$ . Le cellule, seminate e mantenute secondo le condizioni riportate nei Materiali e Metodi, sono state confrontate con il controllo non trattato, assunto come 100% di vitalità. Come mostrato nel grafico, la percentuale di vitalità si è mantenuta sovrapponibile al controllo in tutte le condizioni testate, senza evidenza di andamento dose-dipendente, indicando assenza di citotossicità alle condizioni sperimentali considerate (Fig. 47).

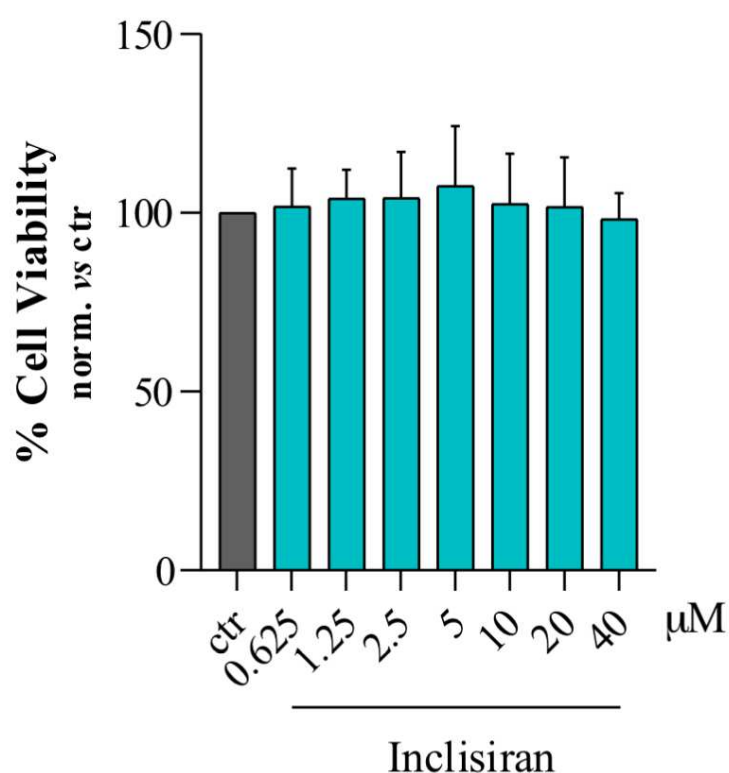


Fig. 47 – Vitalità cellulare di HepG2 trattate con il farmaco Inclisiran a dose crescenti. Non si osservano effetti tossici significativi a nessuna concentrazione.

## 4.2 Inclisiran riduce i livelli proteici e trascrizionali di PCSK9 ed incrementa quelli di LDLR

Dopo aver confermato l'assenza di citotossicità del trattamento con Inclisiran tramite saggio SRB, abbiamo proceduto con la valutazione dei livelli proteici e trascrizionali dei bersagli LDLR e PCSK9 mediante Western Blot e Real Time - qPCR. Le cellule sono state trattate come descritto nei Materiali e Metodi.

Dopo 48 ore di trattamento, come atteso Inclisiran ha prodotto una riduzione significativa dei livelli di espressione proteica di PCSK9 (Fig. 48).

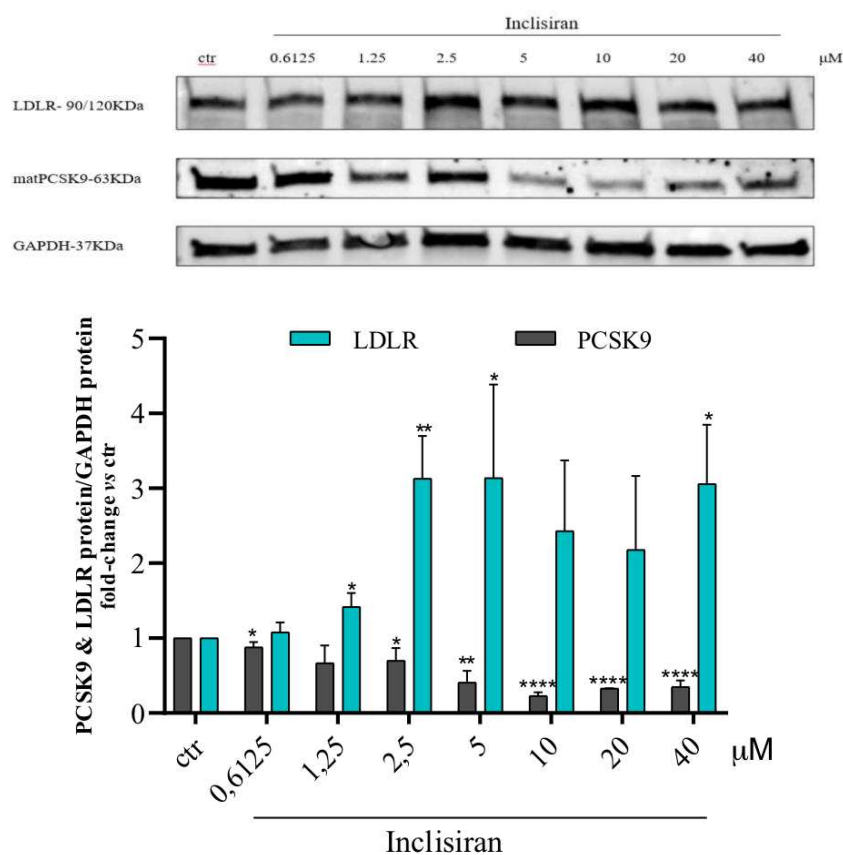


Fig. 48 - Espressione proteica di LDLR e PCSK9 nelle cellule HepG2 trattate con Inclisiran. GAPDH è utilizzato come housekeeping. I dati sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard di due diversi esperimenti (4 serie); \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$  rispetto al controllo.

A partire dalla concentrazione di 1,25  $\mu$ M (-33% vs controllo,  $p < 0,01$ ), con zenit di riduzione alla concentrazione di 10  $\mu$ M (-77% vs controllo,  $p < 0,0001$ ). A tali riduzioni di PCSK9, corrispondono aumenti significativi di espressione LDLR pari a 214% a 5  $\mu$ M ( $p < 0,05$ ) e del 143% a 10  $\mu$ M ( $p$ : non significativo) in confronto alla condizione controllo, producendo quindi un netto effetto in favore del quantitativo di recettore LDL a livello

epatico e quindi, potenzialmente, della captazione delle particelle di colesterolo LDL. Concentrazioni di Inclisiran più alte, 20  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$ , non hanno prodotto un aumento ulteriore in termini di riduzione di PCSK9 rispetto al controllo (-67%,  $p < 0,0001$  e -65%,  $p < 0,0001$ , rispettivamente), risultando quindi leggermente meno efficaci rispetto alla 10  $\mu\text{M}$ . Alle medesime concentrazioni, si è riscontrato un aumento di LDLR pari al 118% e 206% ( $p < 0,05$ ), rispettivamente (Fig. 47). Risultati positivi sono stati osservati anche a 2,5  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$ , con un aumento significativo del 213% e del 214% ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ), rispettivamente.

L'analisi della trascrizione proteica ha invece restituito i seguenti risultati (Fig. 49).

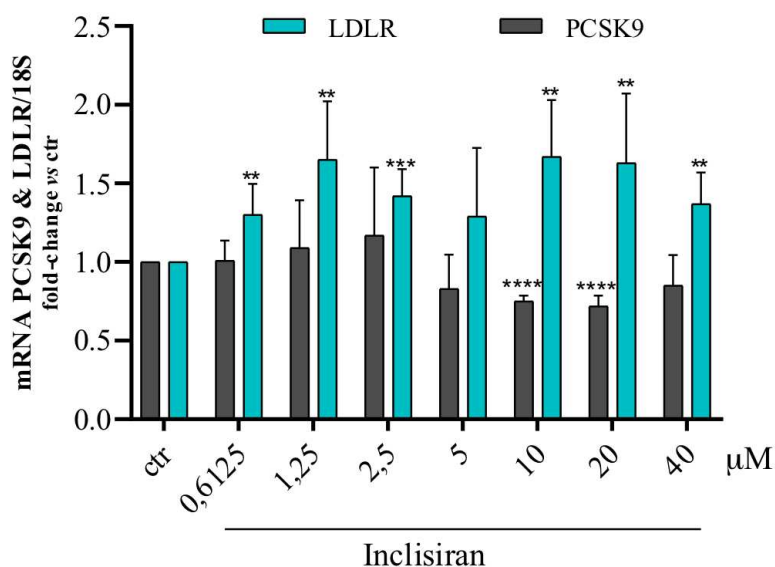


Fig. 49 - Espressione genica di LDLR e PCSK9 nelle cellule HepG2 trattate con Inclisiran. I risultati ottenuti sono stati normalizzati tramite l'utilizzo di 18S come gene di riferimento. I dati sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard di due diversi esperimenti (4 serie); \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$  rispetto al controllo.

Per quanto riguarda PCSK9, le concentrazioni più basse non hanno evidenziato variazioni significative rispetto al controllo, con un incremento limitato al 17% a 2,5  $\mu\text{M}$ . A 5  $\mu\text{M}$  si osserva una leggera tendenza alla riduzione (-18%,  $p$ : non significativa) che diventa significativa alle concentrazioni comprese tra 10 e 20  $\mu\text{M}$  (-26%,  $p < 0,0001$  e -28%,  $p < 0,0001$ , rispettivamente). A 40  $\mu\text{M}$ , il livello trascrizionale risulta inferiore al controllo (-16%,  $p$ : non significativa), sebbene con una riduzione meno pronunciata.

Al contrario, per LDLR è stato osservato un incremento significativo dell'espressione lungo un ampio intervallo di concentrazioni. In particolare, alle concentrazioni di 1,25  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$  l'incremento è stato notevole (65%,  $p < 0,01$ ; 67%,  $p < 0,01$ ; 63%,  $p < 0,01$ , rispettivamente), risultando più modesto, ma statisticamente significativo, alla concentrazione più bassa: 0,625  $\mu\text{M}$  (30%,  $p < 0,01$ ), in linea con quanto osservato a 40  $\mu\text{M}$  (30%,  $p < 0,01$ ).

### 4.3 Inclisiran non riduce in maniera significativa i livelli di secrezione di PCSK9

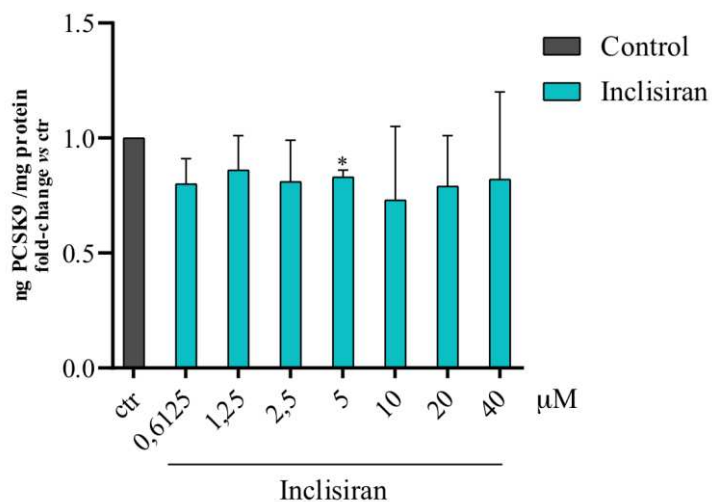


Fig. 50 – Quantificazione della proteina PCSK9 secreta nel mezzo di coltura dalle cellule HepG2. I dati sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard di due diversi esperimenti; \* =  $p < 0,05$  rispetto al controllo.

Al fine di valutare l'espressione della proteina PCSK9 secreta nel terreno di coltura, è stato eseguito un saggio ELISA, con l'obiettivo di caratterizzare in modo più approfondito l'effetto farmacologico di Inclisiran anche sul contenuto proteico extracellulare, oltre che intracellulare.

Rispetto al controllo, i campioni trattati hanno mostrato una riduzione non significativa dei livelli di PCSK9 nel mezzo di coltura per la maggior parte delle concentrazioni testate: -20% a 0,625 µM, -14% a 1,25 µM, -19% a 2,5 µM, -27% a 10 µM, -21% a 20 µM e -18% a 40 µM.

L'unica variazione statisticamente significativa è stata osservata alla concentrazione di 5 µM, con una riduzione del 17% rispetto al controllo ( $p < 0,01$ ).

#### 4.4 Inclisiran risulta essere efficace anche a tempistiche molto brevi

Dopo aver valutato l'attività del farmaco Inclisiran a 48 ore di incubazione tramite quantificazione dei trascritti e delle proteine, è stata scelta la concentrazione di 5  $\mu\text{M}$  per i successivi esperimenti di time-course. L'obiettivo è di determinare il tempo necessario affinché la molecola inizi a manifestare il proprio effetto farmacologico.

Osservando i livelli proteici dei target farmacologici, LDLR mostra già dopo 1 ora di trattamento un incremento significativo pari al 64% ( $p < 0,0001$ ) rispetto al controllo, con un trend di crescita anche alle 2h, seppure non significativo. A partire dalle 4 ore e proseguendo a 8 ore, si osserva una flessione dell'effetto farmacologico (88%,  $p < 0,001$  e 23%,  $p < 0,001$ , rispettivamente), che però aumenta nuovamente a 24 ore, tornando ai livelli precedentemente osservati (151%,  $p < 0,05$ ) (Fig. 51).

PCSK9 mostra una significativa diminuzione a 2 ore dal trattamento, corrispondente a -66% ( $p < 0,01$ ). Nelle rilevazioni a 4 e 8 ore si osserva invece una lieve tendenza all'incremento (-30% e -30%, non significativi rispettivamente), seppur non significativa, che culmina a 24 ore, dove il contenuto proteico torna a concentrazioni similari al controllo (-7, non significativa) (Fig. 51).

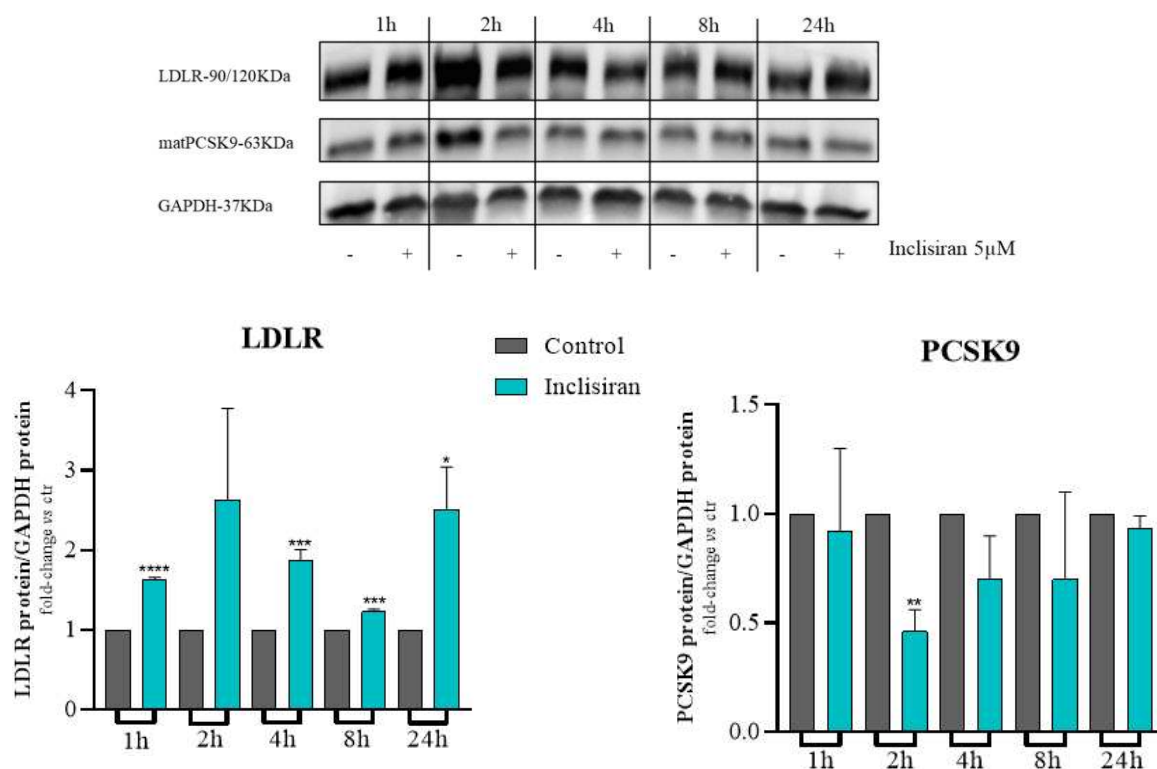


Fig. 51 – Espressione proteica di PCSK9 e LDLR nella linea cellulare HepG2 in seguito a trattamento con Inclisiran a 1h, 2h, 4h, 8h e 24h. I valori sono stati normalizzati usando GAPDH come proteina di riferimento. I dati sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard di due diversi esperimenti; \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$  rispetto al controllo.

L'analisi trascrizionale evidenzia come Inclisiran sia in grado di modulare i livelli di trascritto di PCSK9 già nelle prime ore di trattamento. In particolare, si osserva una riduzione non significativa dell'mRNA di PCSK9 a 1 ora e 2 ore, pari rispettivamente al -50% e al -56% rispetto al controllo, a conferma dell'efficacia del silenziamento mediato dal siRNA. Tale effetto appare parzialmente reversibile nelle ore successive, con un lieve recupero trascrizionale a 4 ore (-18%,  $p$ : non significativo), per poi stabilizzarsi su valori nuovamente inferiori al controllo a 8 ore (-27%) e a 24 ore (-44%), seppure il dato non abbia significatività statistica (Fig. 52).

Parallelamente, l'espressione del recettore per le LDL mostra un andamento opposto, con una tendenza non significativa a crescere a tutte le tempistiche testate (Fig. 52).

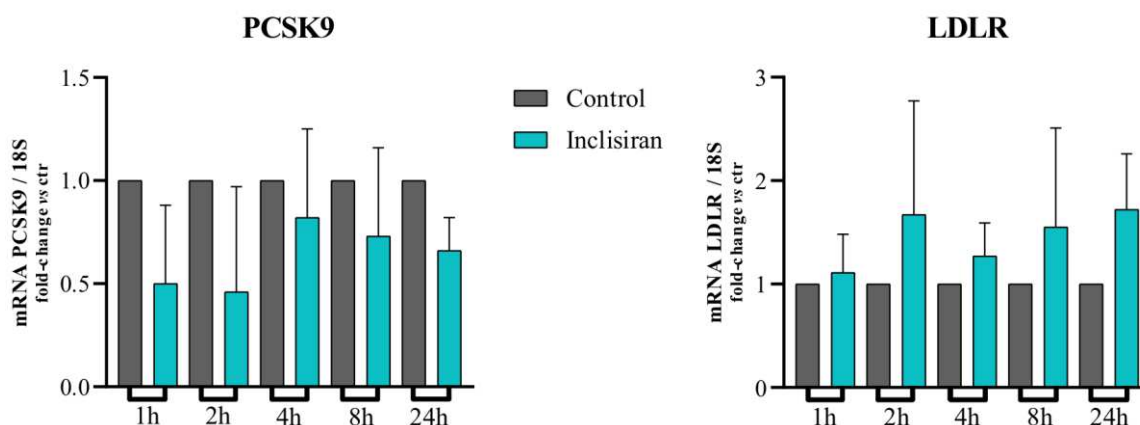


Fig. 52 – Espressione genica di PCSK9 e LDLR nella linea cellulare HepG2 in seguito a trattamento con Inclisiran a 1h, 2h, 4h, 8h e 24h. I risultati ottenuti sono stati normalizzati tramite l'utilizzo di 18S come gene di riferimento. I dati sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard di due diversi esperimenti.

#### 4.5 Inclisiran non modula la secrezione di PCSK9 a tempi brevi

La valutazione dei livelli del PCSK9 secreto nel mezzo di coltura a seguito di trattamento time-course a dose fissa di Inclisiran non ha mostrato variazioni rilevanti, con tendenza a rimanere pressoché costante, nonostante picchi di riduzione significativa dopo 1 e 8 ore dal trattamento, rispettivamente del 7% e del 12%.

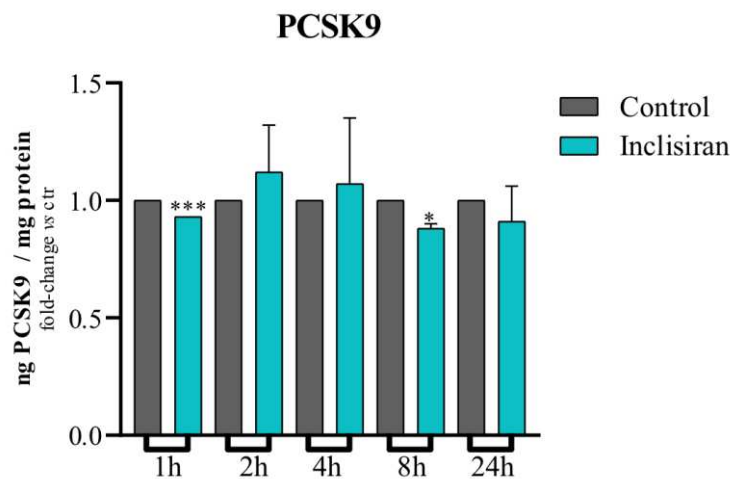


Fig. 53 – Quantificazione della proteina PCSK9 secreta nel mezzo di coltura dalle cellule HepG2 in seguito a trattamento con Inclisiran per 1, 2, 4, 8 e 24 ore. I valori sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard di due esperimenti indipendenti. \* =  $p < 0,05$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  rispetto al controllo.

#### 4.6 Inclisiran contrasta l'induzione di PCSK9 indotta da Simvastatina

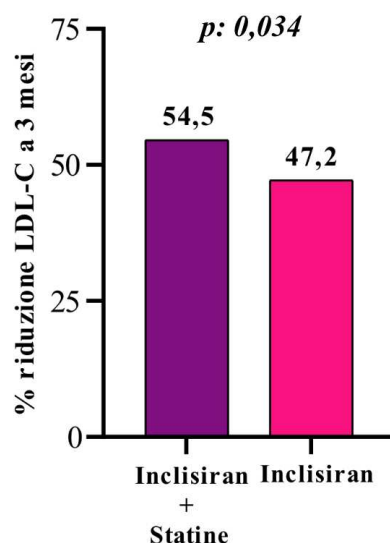


Fig. 54 – Riduzione percentuale del colesterolo LDL a 3 mesi dal trattamento con Inclisiran-Statine rispetto a Inclisiran in monoterapia nel registro INCLIVEN (12 centri del Veneto; n = 240 arruolati, n = 238 valutati a 3 mesi). Le colonne riportano la media della variazione percentuale dal basale a 3 mesi: 54,5% con Statine vs 47,2% senza Statine; ( $p = 0,034$ )<sup>70</sup>.

La Fig. 54 riporta i valori plasmatici di colesterolo LDL in una coorte dello studio INCLIVEN che ha arruolato 240 pazienti che presentavano: ASCVD (211 pazienti, 87,9%), HEF (30 pazienti, 12,5%), ipertensione (164 pazienti, 68,3%), diabete mellito (60 pazienti, 25%), malattia renale cronica (28 pazienti, 11,7%), sindrome coronarica acuta (70 pazienti, 29,1%), distribuiti su 12 centri di reclutamento della Regione Veneto. I pazienti, già in terapia con: Statine (168 pazienti, 70%), Ezetimibe (201 pazienti, 83,8%), Acido Bempedoico (27 pazienti, 11,3%), sono stati randomizzati a ricevere Inclisiran (72 pazienti, 30%) o Inclisiran + Statina (168 pazienti, 70%). I pazienti in trattamento combinato hanno mostrato, dopo 3 mesi, una maggior riduzione dei valori di colesterolo LDL (-54,5%) rispetto ai pazienti in monoterapia aggiuntiva (-47,2%), suggerendo come l'aggiunta di Inclisiran ad un regime farmacologico comprendente l'utilizzo di Statina alla massima dose tollerata sia una scelta ottimale<sup>70</sup>.

Date queste evidenze cliniche, si è voluto replicare *in vitro* le condizioni di trattamento dello studio INCLIVEN, al fine di valutare l'andamento dell'espressione del recettore LDL e di PCSK9 sia a livello di trascritto che a livello di proteina.

Come descritto in Materiali e Metodi, le cellule HepG2 sono state trattate con due diverse dosi di Inclisiran e due diverse dosi di Simvastatina. Inclisiran è stato testato a 2,5  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$  e la Simvastatina a 10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ , sia in trattamenti singoli che in co-trattamento. L'obiettivo sperimentale era verificare se la riduzione della trascrizione di PCSK9 indotta da Inclisiran fosse in grado di modulare l'incremento indotto dalla Simvastatina.

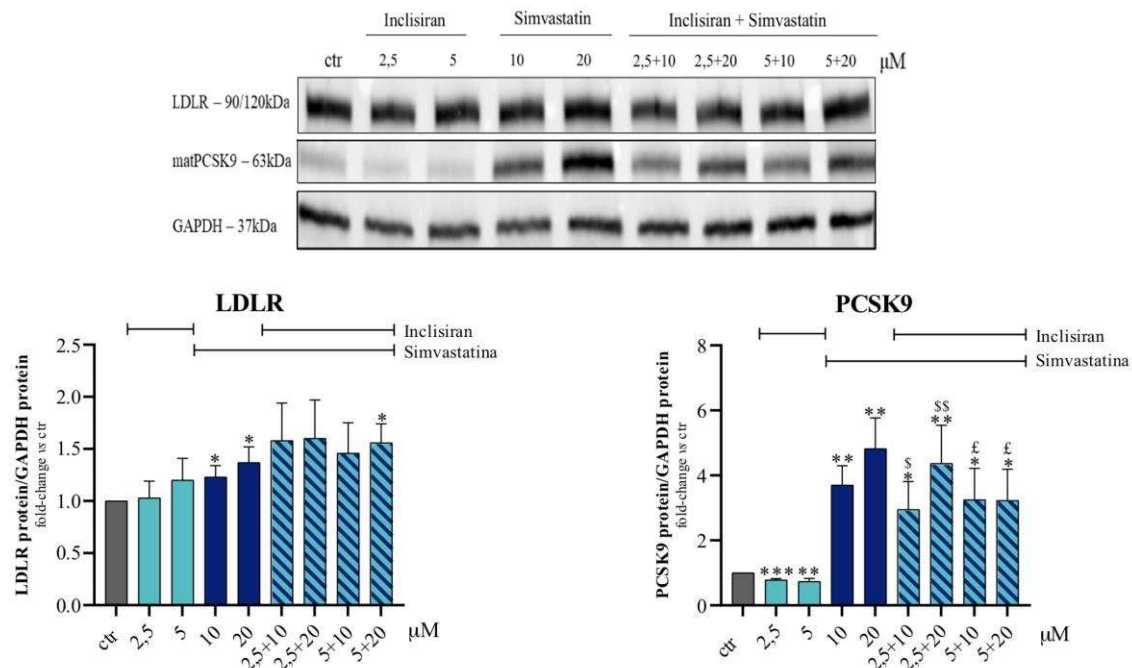


Fig. 55 – Espressione proteica di PCSK9 e LDLR nella linea cellulare HepG2 in seguito a trattamento monoterapico con Inclisiran 2,5  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$ , Simvastatina 10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ , e co-trattamento dei due. I valori sono stati normalizzati usando GAPDH come proteina di riferimento. I dati sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard di due diversi esperimenti; \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$  rispetto al controllo; \$ =  $p < 0,05$ , \$\$ =  $p < 0,01$  vs 2,5  $\mu\text{M}$  Inclisiran; £ =  $p < 0,05$  vs 5  $\mu\text{M}$  Inclisiran.

Come atteso, Inclisiran ha determinato una significativa riduzione dei livelli intracellulari di PCSK9, con un trend dose-dipendente (-22% a 2,5  $\mu\text{M}$  e -26% a 5  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$  e  $p < 0.01$ , rispettivamente). Al contrario, ed in linea con quanto riportato in letteratura, la Simvastatina ha indotto un aumento significativo dell'espressione di PCSK9 (270% a 10  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.01$ , e 382% a 20  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.01$ ).

L'aggiunta di Inclisiran al trattamento con Simvastatina (10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ ) ha ridotto significativamente i livelli proteici di PCSK9 in entrambe le condizioni testate, suggerendo come tale aggiunta sia efficace nel contrastare l'incremento di PCSK9 indotto dalla Simvastatina (Fig. 55).

Per quanto riguarda il recettore per le LDL, la combinazione di Inclisiran + Simvastatina comporta un incremento netto nei confronti di LDLR a fronte del calo prodotto sul PCSK9 (Fig. 55), a corroborare ancora una volta l'efficacia del trattamento combinato, in accordo con le evidenze cliniche che hanno mostrato risultati favorevoli (Fig. 54).

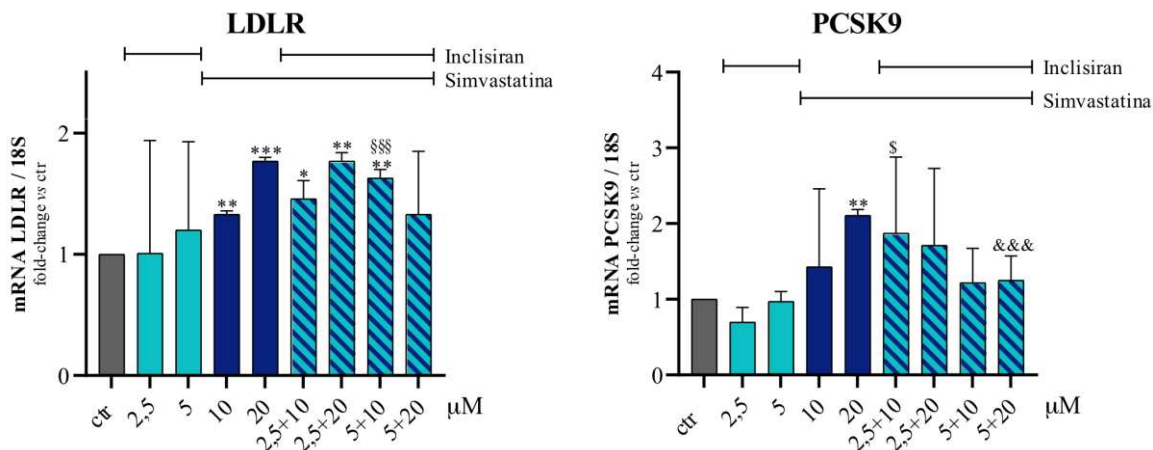


Fig. 56 – Espressione genica di PCSK9 e LDLR nella linea cellulare HepG2 in seguito a trattamento monoterapico con Inclisiran 2,5 μM e 5 μM, Simvastatina 10 μM e 20 μM, e co-trattamento dei due. I risultati ottenuti sono stati normalizzati tramite l'utilizzo di 18S come gene di riferimento. I dati sono presentati come media ± deviazione standard di due diversi esperimenti; \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  rispetto al controllo; § =  $p < 0,05$  vs 2,5 μM Inclisiran; §§§ =  $p < 0,001$  vs 10 μM Simvastatina; &&& =  $p < 0,001$  vs 20 μM Simvastatina.

L'analisi trascrizionale di PCSK9 evidenzia un andamento pienamente coerente con quanto osservato a livello proteico mediante Western Blot. La sola somministrazione di simvastatina 20 μM determina un aumento significativo dell'mRNA di PCSK9 (111%,  $p < 0,01$ ), mentre la cosomministrazione del siRNA attenua di molto tale incremento. Questi risultati confermano la capacità di Inclisiran di contrastare l'induzione trascrizionale di PCSK9 mediata dalla Simvastatina, in maniera dose-dipendente, ad ulteriore supporto del suo meccanismo d'azione.

L'espressione di LDLR mostra un incremento significativo in seguito al trattamento con Simvastatina, sia alla concentrazione di 10 μM (33%,  $p < 0,01$ ) sia a 20 μM (77%,  $p < 0,001$ ). L'aggiunta di Inclisiran determina tuttavia un andamento non lineare, caratterizzato da variazioni oscillanti del contenuto proteico. In particolare, si osserva una riduzione al 46% nella combinazione 2,5 μM Inclisiran + 10 μM Simvastatina ( $p < 0,05$ ), seguita da un aumento al 77% con 2,5 μM Inclisiran + 20 μM Simvastatina ( $p < 0,001$ ) e terminata con una lieve flessione al 63% con 5 μM Inclisiran + 10 μM Simvastatina ( $p < 0,01$ ).

#### 4.7 L'augmentata secrezione di PCSK9 indotta da Simvastatina viene modulata efficacemente da Inclisiran

Coerentemente con i dati ottenuti tramite Western Blot e RT-qPCR, anche l'analisi mediante saggio ELISA ha mostrato una riduzione del contenuto extracellulare di PCSK9 in seguito ai trattamenti con Inclisiran e Simvastatina.

In particolare, mentre il monotrattamento con Simvastatina ha determinato un incremento significativo dell'espressione proteica secreta pari al 55% ( $p < 0,01$ ) alla concentrazione di 10  $\mu\text{M}$ , la dose combinata ad Inclisiran ha indotto una riduzione dei livelli extracellulari di PCSK9. Nello specifico le percentuali rilevate sono risultate pari al 45% per la combinazione 2,5  $\mu\text{M}$  Inclisiran + 10  $\mu\text{M}$  Simvastatina ( $p < 0,01$  vs 2,5  $\mu\text{M}$  Inclisiran), al 47% per 2,5  $\mu\text{M}$  Inclisiran + 20  $\mu\text{M}$  Simvastatina ( $p < 0,05$  vs 2,5  $\mu\text{M}$  Inclisiran) e al 33% per la dose 5  $\mu\text{M}$  Inclisiran + 20  $\mu\text{M}$  Simvastatina ( $p < 0,05$  vs controllo).

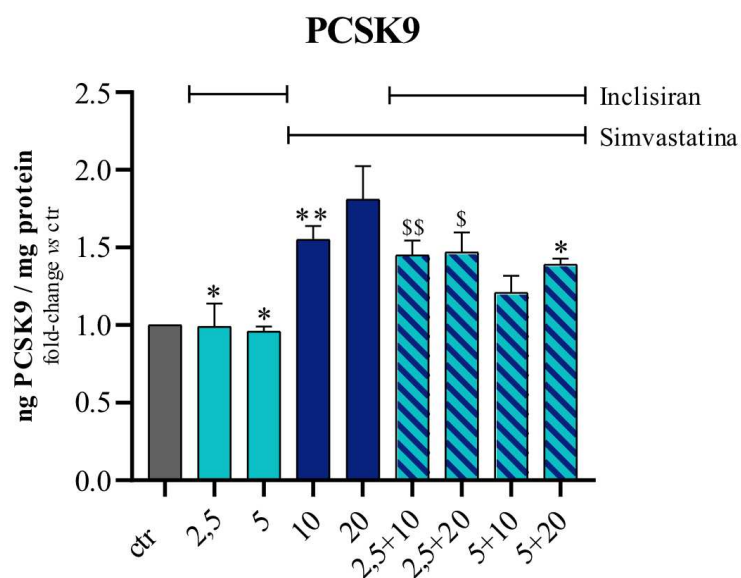


Fig. 57 - Quantificazione della proteina PCSK9 secreta nel mezzo di coltura dalle cellule HepG2 in seguito a trattamento monoterapico con Inclisiran 2,5  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$ , Simvastatina 10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ , e co-trattamento dei due. I dati sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard di due diversi esperimenti; \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$  rispetto al controllo; \$ =  $p < 0,05$ , \$\$ =  $p < 0,01$  vs 2,5  $\mu\text{M}$  Inclisiran.



## 5. Discussione

Dopo un evento coronarico acuto, i livelli circolanti di PCSK9 aumentano notevolmente, motivo per il quale vari studi si sono concentrati sul beneficio che l'introduzione degli anticorpi monoclonali anti-PCSK9 possa apportare nel ridurre ulteriormente i livelli di colesterolo LDL in tali pazienti, che difficilmente raggiungono i target desiderati con le terapie ipolipidizzanti attualmente raccomandate dalle linee guida.

Inclisiran è un piccolo RNA interferente (siRNA) a doppio filamento che utilizza il naturale meccanismo cellulare di interferenza dell'RNA, mediata dal complesso RISC, per ridurre in modo selettivo l'espressione epatica di PCSK9 ed aumentare i livelli di captazione del colesterolo LDL dal circolo ematico. Ad oggi, il suo uso è stato approvato in pazienti con ipercolesterolemia primaria (eterozigote familiare e non) o dislipidemia mista, in aggiunta alla dieta ed alle altre terapie ipolipidizzanti in atto.

L'efficacia clinica del farmaco è stata dimostrata dal programma ORION, che ha evidenziato una riduzione media del 50% del colesterolo LDL con un profilo di somministrazione semestrale. Nonostante questi risultati clinici, la sua efficacia a tempi molto brevi per il suo utilizzo immediato in pazienti ospedalizzati per sindrome coronarica acuta (SCA), in aggiunta alla terapia considerata gold standard, è stata ad oggi poco esplorata. Di recente pubblicazione è il paper di Lupi *et al.*<sup>71</sup> che ha vagliato questa possibilità con uno studio prospettico, non interventistico monocentrico in una piccola coorte italiana di 16 pazienti SCA (93.8% di sesso maschile, età media 60 anni, LDL-c > 140mg/dl se non già in trattamento ipolipidizzante o > 110mg/dl se già in trattamento ipolipidizzante) trattati con atorvastatina 40 mg ed ezetimibe 10 mg una volta al giorno, ed altri trattamenti ipolipidizzanti in accordo con le linee guida per il trattamento dei pazienti SCA. L'aggiunta di Inclisiran entro 4 giorni dall'evento e dopo aver valutato i livelli di colesterolo LDL ha portato ad un calo altamente significativo dei livelli di colesterolo totale e di colesterolo LDL a 15 giorni e a 30 giorni dall'evento, corroborando l'ipotesi che l'immediato utilizzo di Inclisiran in questa classe di pazienti possa apportare benefici non di poco conto.

I nostri studi *in vitro* in cellule HepG2 di epatocarcinoma umano si sono introdotti in questo scenario permettendo di valutare l'effetto molecolare del trattamento a molto breve termine di inclisiran da solo o in aggiunta al trattamento con Statina, permettendo di valutarne in modo diretto la farmacodinamica cellulare, fornendo informazioni complementari e non ricavabili dagli studi clinici.

Le concentrazioni designate per gli esperimenti variano da 0,625  $\mu\text{M}$  fino a 40  $\mu\text{M}$ , raddoppiando progressivamente la dose. I saggi di vitalità cellulare non hanno evidenziato alcun tipo di tossicità a queste dosi, confermando le scelte iniziali e permettendo di proseguire con l'analisi degli effetti farmacologici sui target PCSK9 e LDLR.

L'incubazione di 48 ore ha evidenziato una netta riduzione della concentrazione proteica di PCSK9, con il massimo effetto inibitorio alla concentrazione di 10  $\mu\text{M}$ , cui si associa il più alto incremento del recettore per le LDL alla concentrazione di 5  $\mu\text{M}$ . A livello trascrizionale il profilo ottenuto rispecchia quanto osservato a livello proteico, confermando la massima azione farmacologica alla medesima concentrazione di 10  $\mu\text{M}$ .

L'analisi delle proteine extracellulari ha invece prodotto risultati che, nella maggior parte dei casi, non raggiungono significatività statistica. Questo andamento è plausibilmente legato alle tempistiche sperimentali piuttosto brevi, che non hanno consentito un'adeguata secrezione proteica nel terreno di coltura.

La conferma dell'attività farmacologica della molecola ha quindi posto le basi per la seconda fase del progetto: definire il tempo necessario affinché il farmaco inizi a manifestare i primi effetti misurabili. Mentre gli studi clinici del programma ORION si focalizzano su efficacia, sicurezza e aderenza a medio-lungo termine, con prime valutazioni effettuate non prima di 14 giorni dalla somministrazione, mancava una caratterizzazione delle tempistiche iniziali di insorgenza del segnale farmacologico. Gli esperimenti hanno pertanto indagato diversi time point precoci (1 ora, 2 ore, 4 ore, 8 ore, 24 ore) utilizzando la concentrazione di 5  $\mu\text{M}$ . Questa scelta è stata motivata dall'esigenza di evitare il massimo silenziamento ottenibile di PCSK9, alla dose di 10  $\mu\text{M}$ , risultata la più efficace, e di mantenere quindi una finestra di risposta sufficiente a cogliere le variazioni temporali nelle prime fasi di trattamento.

Le analisi dei livelli trascrizionali di PCSK9 hanno mostrato una riduzione che si discosta dalla significatività. Questo risultato suggerisce che, in questa fase precoce, il silenziamento non ha ancora raggiunto un'efficienza sufficiente a determinare un decremento misurabile dell'mRNA totale cellulare. Tale comportamento è coerente con la cinetica nota dei siRNA GalNAc-coniugati, nei quali il tempo necessario per l'accumulo intracellulare è di poche ore, ma l'interazione siRNA-RISC richiede più tempo per arrivare a dosi farmacologicamente apprezzabili<sup>72</sup>. Il medesimo ragionamento vale per LDLR, il quale mostra sì un aumento, ma senza alcuna significatività. Questo risultato potrebbe riflettere una risposta compensatoria precoce alla riduzione funzionale di PCSK9 che inizia ad instaurarsi a livello post-trascrizionale, oppure un effetto indipendente mediato dall'attivazione di meccanismi intracellulari secondari al trattamento.

La valutazione delle proteine ha invece fornito un quadro più chiaro della dinamica iniziale del farmaco. I livelli proteici di PCSK9 dimostrano una riduzione significativa a 2 ore dall'incubazione, confermata dalle bande del Western blot, e si mantengono inferiori al controllo nelle tempistiche successive, seppur con una tendenza non significativa all'aumento.

Parallelamente, il recettore LDLR mostra un aumento proteico marcato e statisticamente significativo in quasi tutte le tempistiche selezionate. L'incremento è pronunciato dalla quarta ora in poi, probabilmente motivato da una minore disponibilità della proteina matura che comporta una diminuzione dell'indirizzamento lisosomiale del recettore, con accumulo di LDLR riciclati sulla membrana cellulare. Queste affermazioni potrebbero indicare che il silenziamento esercitato dal complesso RISC diventi misurabile a livello proteico prima che la riduzione dell'mRNA totale sia quantificabile.

L'ultima parte del progetto è stata sviluppata alla luce dalle evidenze cliniche dello studio INCLIVEN, condotto dall'Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona, che hanno dimostrato un beneficio significativo derivante dall'associazione Simvastatina-Inclisiran in pazienti presentanti patologie cardio-metaboliche ad alto rischio cardiovascolare. In particolare, la riduzione relativa del colesterolo LDL è stata del 15,7% rispetto alla somministrazione del solo Inclisiran<sup>70</sup>.

Sulla base di queste osservazioni, l'interazione farmacologica tra i 2 trattamenti è stata approfondita *in vitro*, valutando la modulazione dei target molecolari PCSK9 e LDLR.

Questo aspetto è di primaria importanza poiché le Statine sono note per aumentare i livelli di PCSK9, potenzialmente attenuabili dall'inibizione di Inclisiran.

Come atteso, la combinazione colloca i livelli di PCSK9 sistematicamente su valori intermedi tra l'inibizione mediata da Inclisiran e l'incremento indotto da Simvastatina. L'effetto di controbilanciamento è osservabile a livello proteico, trascrizionale e nel contenuto extracellulare, risultando particolarmente visibile nelle combinazioni a più alta concentrazione, dove la riduzione di PCSK9 si accompagna ad una significatività multipla rispetto ai singoli gruppi di riferimento.

Parallelamente, l'analisi dei livelli di LDLR ha evidenziato che la combinazione mantiene un incremento del recettore sovrapponibile, o lievemente superiore, a quello osservato con i singoli trattamenti. In alcune condizioni, l'aumento dei livelli proteici e trascrizionali risulta statisticamente significativo rispetto al controllo e alle monoterapie a concentrazioni più basse.

La conferma sperimentale che i livelli di PCSK9 diminuiscono grazie al siRNA anche in presenza della stimolazione indotta dalle Statine, e che le concentrazioni recettoriali rimangono elevate, avvalora l'utilizzo simultaneo dei 2 trattamenti. L'obiettivo terapeutico principale resta infatti la riduzione del colesterolo LDL circolante: la combinazione permette di mantenere il recettore su valori elevati mentre la proteina che ne riduce la disponibilità viene efficacemente limitata. Considerando questi dati, il solo Inclisiran non appare sufficiente per raggiungere la massima risposta, così come la sola Simvastatina risulta penalizzata dall'aumento compensatorio di PCSK9. L'impiego combinato dei due farmaci emerge quindi come un approccio terapeutico solido e promettente, in attesa che nuove molecole o strategie dimostrino un'efficacia superiore.



## **6. Conclusione**

In conclusione, l'aggiunta immediata di Inclisiran alla terapia gold standard in pazienti SCA – una classe di pazienti esclusa dai criteri di inclusione degli studi ORION e per la prima volta oggetto di inclusione nello studio VICTORION-INCEPTION - è fortemente avvalorata da questi esperimenti *in vitro*. Infatti, la sua azione rapida rappresenta un vantaggio particolarmente promettente in questo contesto clinico, in cui le terapie tradizionali per la riduzione dei lipidi, anche quando ottimizzate, spesso richiedono diverse settimane per raggiungere il loro massimo effetto, lasciando i pazienti a un rischio aumentato di eventi cardiovascolari ricorrenti nel periodo post-SCA precoce, un momento in cui il rischio di complicanze è particolarmente elevato. Riducendo significativamente i livelli di LDL-C in pochi giorni, Inclisiran potrebbe contribuire efficacemente a colmare questo importante vuoto terapeutico, offrendo la possibilità di migliorare gli esiti e proteggere meglio i pazienti durante questo periodo vulnerabile. In aggiunta, la vantaggiosa opportunità di due infusioni/anno potrebbe favorire l'uso di inclisiran nei pazienti SCA piuttosto che l'uso dei monoclonali e quindi migliorare l'aderenza alla terapia nel lungo periodo.



## 7. Bibliografia

1. Maxfield, F. R.; van Meer, G. Cholesterol, the Central Lipid of Mammalian Cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010, 22 (4), 422–429. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.05.004>.
2. Cerqueira NMFS, Oliveira EF, Gesto DS, Santos-Martins D, Moreira C, Moorthy HN, Ramos MJ, Fernandes PA. Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry.* 2016;55(39):5483-5506. doi:10.1021/acs.biochem.6b00342.
3. Fan J. Atherosclerosis: known and unknown. *Pathol Int.* 2022;72(10):671-683. doi:10.1111/pin.13336.
4. Dixon, D. L.; Riche, D. M. Dyslipidemia. In *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, 11e; DiPiro, J. T., Yee, G. C., Posey, L. M., Haines, S. T., Nolin, T. D., Ellingrod, V., Eds.; McGraw-Hill Education: New York, NY, 2020.
5. Lehninger AL, Nelson DL, Cox ML. *I principi di biochimica di Lehninger*. 5. ed. Zanichelli; 2010.
6. Dixon DL, Riche DM. Dyslipidemia. In: DiPiro JT, Yee GC, Posey LM, Haines ST, Nolin TD, Ellingrod V, eds. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach, 11e*. McGraw-Hill Education; 2020. Accessed August 21, 2025. [accesspharmacy.mhmedical.com/content.aspx?aid=1197340927](https://accesspharmacy.mhmedical.com/content.aspx?aid=1197340927)
7. Abifadel M, Varret M, Rabès J-P, Gautier-C, Boileau C. Genetic and molecular architecture of familial hypercholesterolemia. *J Intern Med.* 2023;293(2):144-165. doi:10.1111/joim.13577.
8. Salamat, M. S. Robbins and Cotran: Pathologic Basis of Disease, 8th Edition. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2010, 69 (2), 214–214. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181cd8dbc>.
9. Melendez QM, Krishnaji ST, Wooten CJ, Lopez D. Hypercholesterolemia: The role of PCSK9. *Arch Biochem Biophys.* 2017;625–626:39–53. doi:10.1016/j.abb.2017.06.001.
10. Ciaccio M, Lippi G, editors. *Biochimica clinica e medicina di laboratorio*. 3<sup>a</sup> ed. Napoli: EdiSES; 2020. ISBN: 9788836230228.
11. Konstantinov IE, Mejevoi N, Anichkov NM. Nikolai N. Anichkov and his theory of atherosclerosis. *Tex Heart Inst J.* 2006;33(4):417–423. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1764970/>
12. Von Scheidt M, Zhao Y, Kurt Z, Pan C, Zeng L, Yang X, et al. Applications and limitations of mouse models for understanding human atherosclerosis. *Cell Metab.* 2017;25(2):248–261. doi:10.1016/j.cmet.2016.11.001.
13. Rubin R, Strayer DS, Rubin E. *Patologia generale. Patologia d'organo e molecolare*. 6<sup>a</sup> ed.

14. Fan J, Chen Y, Yan H, Liu B, Wang Y, Zhang J, et al. Genomic and transcriptomic analysis of hypercholesterolemic rabbits: progress and perspectives. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3512. doi:10.3390/ijms19113512. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6274909/>
15. Fan J, Watanabe T. Inflammatory Reactions in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2003. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jat/10/2/10\\_2\\_63/pdf/-char/en](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jat/10/2/10_2_63/pdf/-char/en) (accessed 2025-06-04).
16. Società Italiana per lo Studio dell'Aterosclerosi (SISA). *Giornale Italiano dell'Aterosclerosi – Numero 1/2021: Aterosclerosi.* Milano: SISA; 2021. Disponibile da: [http://www.sisa.it/upload/GIA\\_2021\\_n1\\_Aterosclerosi.pdf](http://www.sisa.it/upload/GIA_2021_n1_Aterosclerosi.pdf)
17. Behbodikhah J, Ahmed S, Elyasi A, Kasselmann LJ, De Leon J, Glass AD, et al. Apolipoprotein B and cardiovascular disease: biomarker and potential therapeutic target. *Metabolites.* 2021;11(10):690. doi:10.3390/metabo11100690.
18. Li T, Li X, Feng Y, Dong G, Wang Y, Yang J. The role of matrix metalloproteinase-9 in atherosclerotic plaque instability. *Mediators Inflamm.* 2020;2020:3872367. doi:10.1155/2020/3872367.
19. Cerit L. Fibrinogen and atherosclerosis. *Arq Bras Cardiol.* 2017;108(2):189-190. doi:10.5935/abc.20170017.
20. Neumann JT, Twerenbold R, Weimann J, Ballantyne CM, Benjamin EJ, Costanzo S, et al. Prognostic value of cardiovascular biomarkers in the population. *JAMA.* 2024;331(22):1898. doi:10.1001/jama.2024.5596.
21. Lechner K, von Schacky C, McKenzie AL, Worm N, Nixdorff U, Lechner B, et al. Lifestyle factors and high-risk atherosclerosis: pathways and mechanisms beyond traditional risk factors. *Eur J Prev Cardiol.* 2020;27(4):394-406. doi:10.1177/2047487319869400.
22. Rao SV, O'Donoghue ML, Ruel M, Rab T, Tamis-Holland JE, Alexander JH, et al. 2025 ACC/AHA/ACEP/NAEMSP/SCAI Guideline for the management of patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2025;151(13):e771-e862. doi:10.1161/CIR.0000000000001309.
23. Yuan D, Chu J, Qian J, Lin H, Zhu G, Chen F, Liu X. New concepts on the pathophysiology of acute coronary syndrome. *Rev Cardiovasc Med.* 2023;24(4):112. doi:10.31083/j.rcm2404112.
24. Couch LS, Channon K, Thum T. Molecular mechanisms of Takotsubo syndrome. *Int J Mol Sci.* 2022;23(20):12262. doi:10.3390/ijms232012262.
25. Ndoj K, [altri autori]. The low-density lipoprotein receptor: emerging post-transcriptional regulatory mechanisms. *Atherosclerosis.* 2024;388:123602. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2024.123602.

26. May P, Bock HH, Nimpf J, et al. Differential glycosylation regulates processing of lipoprotein receptors by  $\gamma$ -secretase. *J Biol Chem.* 2003;278(37):37386-37392. doi:10.1074/jbc.M305432200.
27. Prévost M, Breukink E, Pagano M, et al. Low density lipoprotein receptor class A repeats are O-glycosylated in linker regions. *J Biol Chem.* 2014;289(25):17312-17323. doi:10.1074/jbc.M114.560250.
28. Goldstein JL, Brown MS. History of discovery: the LDL receptor. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S120-S125. doi:10.1194/jlr.R800085-JLR200.
29. Anderson RGW, Brown MS, Goldstein JL. Identification of a VLDL-induced, FDNPVY-independent internalization mechanism for the LDLR. *EMBO J.* 2007;26(13):3273-3282. doi:10.1038/sj.emboj.7601769.
30. Goldstein, J. L.; Brown, M. S.; Anderson, R. G. W.; Russell, D. W.; Schneider, W. J. Receptor-Mediated Endocytosis: Concepts Emerging from the LDL Receptor System. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1985, 1 (1), 1–39. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.01.110185.000245>.
31. Schmidt, H. M.; Jarrett, K. E.; De Aguiar Vallim, T. Q.; Tarling, E. J. Pathways and Molecular Mechanisms Governing LDL Receptor Regulation. *Circ. Res.* 2025, 136 (8), 902–919. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.124.323578>.
32. Abifadel M, Varret M, Bourbon M, et al. Targeting PCSK9 to tackle cardiovascular disease. *Pharmacol Ther.* 2023;248:108475. doi:10.1016/j.pharmthera.2023.108475.
33. He, Z.; Khatib, A.-M.; Creemers, J. W. M. The Proprotein Convertase Furin in Cancer: More than an Oncogene. *Oncogene* 2022, 41 (9), 1252–1262. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-02175-9>.
34. Ajoobabady A, Aslkhodapasandhokmabad M, Sahebkar A, et al. PCSK9 in metabolism and diseases. *Metabolism.* 2025;163:156064. doi:10.1016/j.metabol.2024.156064.
35. Zimetti F, Caffarra P, Ronda N, et al. Increased PCSK9 Cerebrospinal Fluid Concentrations in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2016;55(1):315-320. doi:10.3233/JAD-160411
36. Gao, Y.; Qiu, Y.; Wu, J.; Diao, W.; Zhang, H.; Wang, S.; Du, Z.; Dong, J.; Zhang, M.; Jiang, L. Acute-Phase Plasma PCSK9 Levels and Recurrent Cardiovascular Events in a Chinese Acute Myocardial Infarction Cohort. *Cardiology* 2018, 141 (2), 88–97. <https://doi.org/10.1159/000493785>.
37. Ogura M. PCSK9 inhibition in the management of familial hypercholesterolemia. *J Cardiol.* 2018;71(1):1-7. doi:10.1016/j.jjcc.2017.07.002.
38. Dubuc, G.; Chamberland, A.; Wassef, H.; Davignon, J.; Seidah, N. G.; Bernier, L.; Prat, A. Statins Upregulate PCSK9, the Gene Encoding the Proprotein Convertase Neural Apoptosis-Regulated Convertase-1 Implicated in Familial Hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004, 24 (8), 1454–1459. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000134621.14315.43>.

39. Horton, J. D.; Shah, N. A.; Warrington, J. A.; Anderson, N. N.; Park, S. W.; Brown, M. S.; Goldstein, J. L. Combined Analysis of Oligonucleotide Microarray Data from Transgenic and Knockout Mice Identifies Direct SREBP Target Genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003, 100 (21), 12027–12032. <https://doi.org/10.1073/pnas.1534923100>.
40. Cui Y, Zheng X, Zhang Y, et al. Sex difference in circulating PCSK9 and its clinical implications. *Front Pharmacol.* 2022;13:953845. doi:10.3389/fphar.2022.953845.
41. Endo, A.; Kuroda, M.; Tsujita, Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, New Inhibitors of Cholesterogenesis Produced by *Penicillium Citrinum*. *J. Antibiot. (Tokyo)* 1976, 29 (12), 1346–1348. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.29.1346>.
42. Alberts, A. W.; Chen, J.; Kuron, G.; Hunt, V.; Huff, J.; Hoffman, C.; Rothrock, J.; Lopez, M.; Joshua, H.; Harris, E.; Patchett, A.; Monaghan, R.; Currie, S.; Stapley, E.; Albers-Schonberg, G.; Hensens, O.; Hirshfield, J.; Hoogsteen, K.; Liesch, J.; Springer, J. Mevinolin: A Highly Potent Competitive Inhibitor of Hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A Reductase and a Cholesterol-Lowering Agent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1980, 77 (7), 3957–3961. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.7.3957>.
43. Sirtori CR. The pharmacology of statins. *Pharmacol Res.* 2014;88:3-11. doi:10.1016/j.phrs.2014.03.002.
44. Yang, C.; Wu, Y.-J.; Qian, J.; Li, J.-J. Landscape of Statin as a Cornerstone in Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Rev. Cardiovasc. Med.* 2023, 24 (12), 373. <https://doi.org/10.31083/j.rcm2412373>.
45. Murphy C, Deplazes E, Cranfield CG, Garcia A. The role of structure and biophysical properties in the pleiotropic effects of statins. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8745. doi:10.3390/ijms21228745.
46. Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science.* 2001;292(5519):1160-1164. doi:10.1126/science.1059344.
47. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Fourteenth edition.; Brunton, L. L., Knollmann, B. C., Gilman, A., Goodman, L. S., Eds.; Pharmacology; McGraw Hill: New York Chicago San Francisco Athens London Madrid Mexico City Milan New Delhi Singapore Sydney Toronto, 2023.
48. Ferri N, Ruscica M, Fazio S, Corsini A. Low-density lipoprotein cholesterol-lowering drugs: a narrative review. *J Clin Med.* 2024;13(4):943. doi:10.3390/jcm13040943.
49. Rajpathak SN, Kumbhani DJ, Crandall J, Barzilai N, Alderman M, Ridker PM. Statin therapy and risk of developing type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care.* 2009;32(10):1924-1929. doi:10.2337/dc09-0738.
50. Averbukh LD, Turshudzhyan A, Wu DC, Wu GY. Statin-induced liver injury patterns: a clinical review. *J Clin Transl Hepatol.* 2022;10(3):543-552. doi:10.14218/JCTH.2021.00271.
51. Vinci P, Panizon E, Tosoni LM, et al. Statin-associated myopathy: emphasis on mechanisms and targeted therapy. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):11687. doi:10.3390/ijms222111687.

52. Golomb BA, Evans MA. Statin adverse effects: a review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2008;8(6):373-418. doi:10.2165/0129784-200808060-00004.
53. Kurdi A, Abukhader I. A narrative review of statin-induced rhabdomyolysis: molecular mechanism, risk factors and management. *Drug Healthc Patient Saf*. 2021;13:211-225. doi:10.2147/DHPS.S307749.
54. European Medicines Agency (EMA). Leqvio (inclisiran) – EPAR Public Assessment Report. Amsterdam: EMA; 2020-2024. Disponibile da: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/leqvio-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/leqvio-epar-public-assessment-report_en.pdf)
55. Thakker D, Parekh D, Patel K, et al. Development of novel siRNA therapeutics: a review with a focus on inclisiran for the treatment of hypercholesterolemia. *Int J Mol Sci*. 2023;24(4):4019. doi:10.3390/ijms24044019.
56. Khvorova A. Oligonucleotide therapeutics—A new class of cholesterol-lowering drugs. *N Engl J Med*. 2017;376(1):4-7. doi:10.1056/NEJMp1614154.
57. Witzigmann, D.; Quagliata, L.; Schenk, S. H.; Quintavalle, C.; Terracciano, L. M.; Huwyler, J. Variable Asialoglycoprotein Receptor 1 Expression in Liver Disease: Implications for Therapeutic Intervention. *Hepatol. Res*. 2016, 46 (7), 686–696. <https://doi.org/10.1111/hepr.12599>.
58. Song J-J, Joshua-Tor L. Argonaute and RNA—getting into the groove. *Curr Opin Struct Biol*. 2006;16(1):5-11. doi:10.1016/j.sbi.2006.01.010.
59. FDA CLINICAL PHARMACOLOGY REVIEW(S). Accessed July 15, 2025. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2022/214012Orig1s000ClinPharmR.pdf?utm\\_source=chatgpt.com](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2022/214012Orig1s000ClinPharmR.pdf?utm_source=chatgpt.com)
60. Ray KK, Landmesser U, Leiter LA, et al. Inclisiran in patients at high cardiovascular risk with elevated LDL cholesterol (ORION-1). *N Engl J Med*. 2017;376(15):1430-1440. doi:10.1056/NEJMoa1615758.
61. Kastelein JJP, Stoekenbroek RM, Baccara-Dinet MT, et al. Long-term efficacy and safety of inclisiran in patients with high cardiovascular risk and elevated LDL cholesterol (ORION-3): 4-year open-label extension of ORION-1. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2023;11(4). doi:10.1016/S2213-8587(22)00353-9.
62. Raal, F. J.; Kallend, D.; Ray, K. K.; Turner, T.; Koenig, W.; Wright, R. S.; Wijngaard, P. L. J.; Curcio, D.; Jaros, M. J.; Leiter, L. A.; Kastelein, J. J. P. Inclisiran for the Treatment of Heterozygous Familial Hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med*. 2020, 382 (16), 1520–1530. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1913805>.
63. Ray KK, Wright RS, Kallend D, et al. Two phase 3 trials of inclisiran in patients with elevated LDL cholesterol. *N Engl J Med*. 2020;382(16):1507-1519. doi:10.1056/NEJMoa1912387.
64. Donato, M. T.; Tolosa, L.; Gómez-Lechón, M. J. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. In *Protocols in In Vitro*

- Hepatocyte Research; Vinken, M., Rogiers, V., Eds.; *Methods in Molecular Biology*; Springer New York: New York, NY, 2015; Vol. 1250, pp 77–93. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_5).
65. Kurien, B. T.; Scofield, R. H. Western Blotting: An Introduction. In *Western Blotting*; Kurien, B. T., Scofield, R. H., Eds.; *Methods in Molecular Biology*; Springer New York: New York, NY, 2015; Vol. 1312, pp 17–30. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7_5).
66. Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* 1985, 150 (1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
67. Kurien, B. T.; Scofield, R. H. Extraction of Proteins from Gels: A Brief Review. In *Protein Electrophoresis*; Kurien, B. T., Scofield, R. H., Eds.; *Methods in Molecular Biology*; Humana Press: Totowa, NJ, 2012; Vol. 869, pp 403–405. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4\\_33](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_33).
68. Hirano, S. Western Blot Analysis. In *Nanotoxicity*; Reineke, J., Ed.; *Methods in Molecular Biology*; Humana Press: Totowa, NJ, 2012; Vol. 926, pp 87–97. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-002-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-002-1_6).
69. Green, M. R.; Sambrook, J. Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2019, 2019 (6), pdb.top095109. <https://doi.org/10.1101/pdb.top095109>.
70. Briani F, Sani E, et al. Real-World Efficacy of Inclisiran in Veneto Region (Italy): The INCLIVEN Multicenter Registry. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2025. doi:10.1007/s10557-025-07749-3.
71. Lupi A, Baluci M, Persampieri S, et al. Inclisiran for fast-track lipid-lowering treatment early after an acute coronary syndrome: a pilot study. *Atheroscler Plus.* 2025 Sep 24;62:9–14. doi: 10.1016/j.athplu.2025.09.005.
72. Nair JK, Attarwala H, Sehgal A, et al. Impact of enhanced metabolic stability on pharmacokinetics and pharmacodynamics of GalNAc–siRNA conjugates. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(19):10969-10977. doi:10.1093/nar/gkx818