

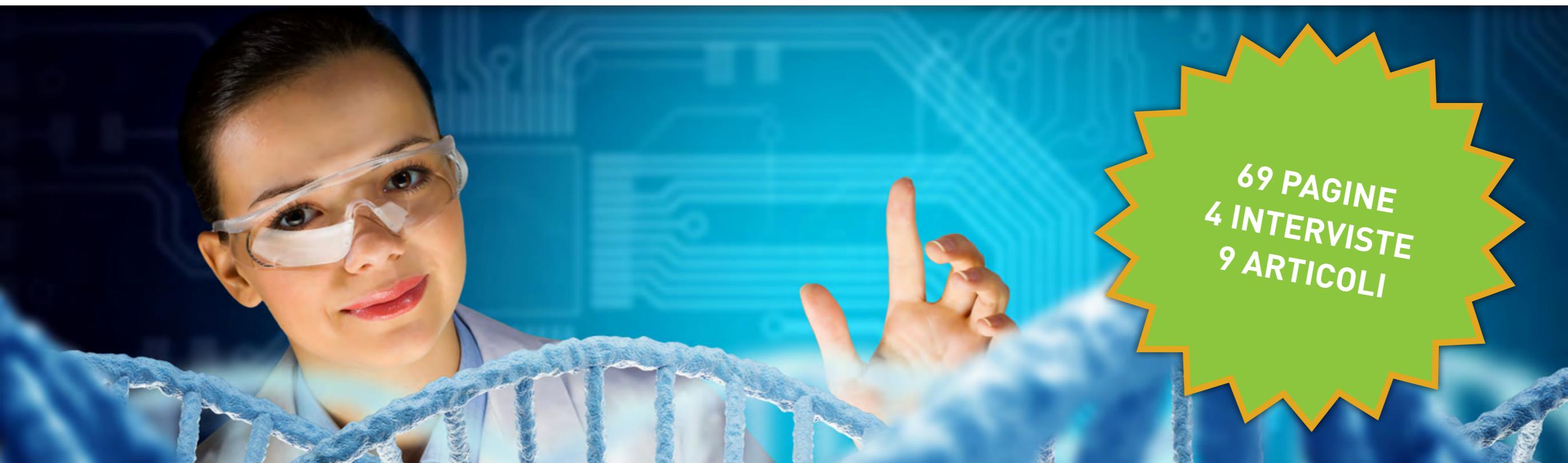
SILENZIAMENTO GENICO: una nuova prospettiva di cura per le malattie rare

WWW.PHARMASTAR.IT

PDF INTERATTIVO



69 PAGINE
4 INTERVISTE
9 ARTICOLI



DNA e RNA



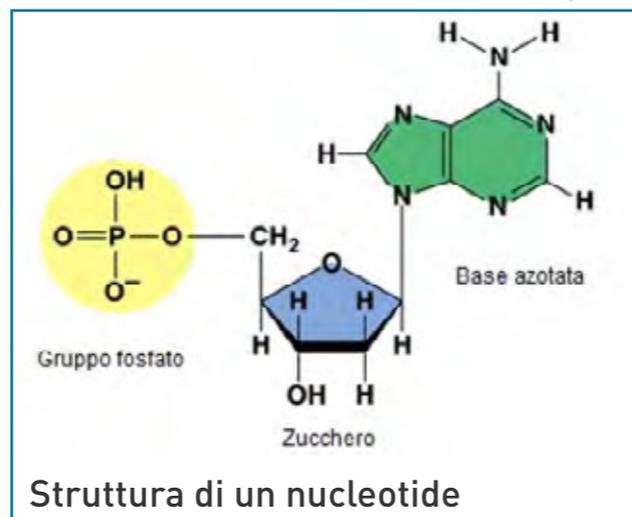
DNA e RNA: cosa sono, a cosa servono e cosa succede quando sono alterati

Come è fatto il DNA

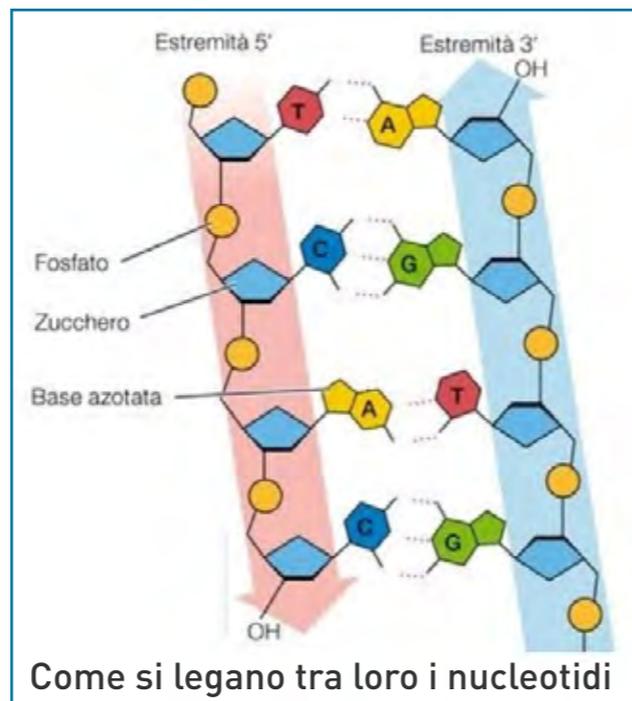
L'informazione genetica di tutti gli organismi viventi è contenuta nel **DNA**. Quest'ultimo è conservato nel nucleo delle cellule, impacchettato in macrostrutture chiamate **cromosomi**. L'uomo possiede 46 cromosomi organizzati in 23 coppie, ereditati per metà dal padre e per metà dalla madre.

Il DNA, o acido desossiribonucleico, è costituito da unità che si ripetono, dette **nucleotidi**. Ogni nucleotide consiste in una base azotata, uno zucchero a cinque atomi di carbonio (desossiribosio) e un gruppo fosfato. Le basi azotate sono quattro: adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C). Ciascun nucleotide è legato a quello precedente e a quello successivo attraverso il gruppo fosfato.

La molecola di DNA è formata da due lunghi filamenti di nucleotidi legati tra loro at-



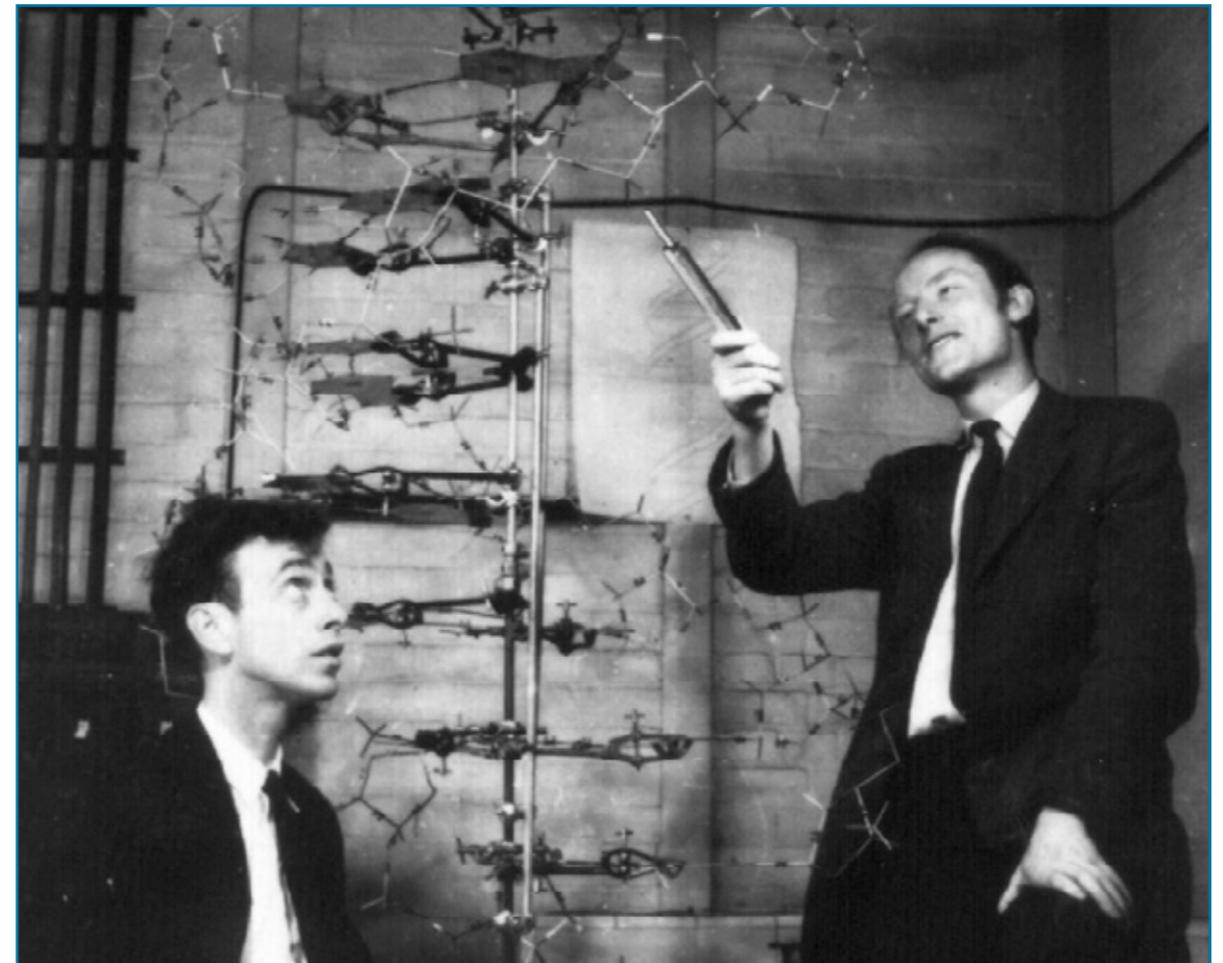
Struttura di un nucleotide



Come si legano tra loro i nucleotidi

traverso legami a idrogeno che si instaurano tra le basi azotate. L'unione tra le basi azotate avviene solo ed esclusivamente tra adenina e timina (A-T) e tra citosina e guanina (C-G). Perciò l'ordine delle basi lungo un filamento determina l'ordine delle basi lungo l'altro.

Questi legami determinano la struttura tridimensionale elicoidale a doppio filamento del DNA. Questa struttura è stata descritta per la prima volta nel 1953 da **Watson e Crick** che poi sono stati insigniti del premio Nobel per questa scoperta nel 1962.



COSA SONO DNA E RNA

Il materiale genetico contenuto all'interno di tutti gli organismi è responsabile delle caratteristiche individuali ed è trasferito attraverso la progenie.

Il DNA e l'RNA sono macromolecole formate da subunità più piccole chiamate nucleotidi. Ogni nucleotide è costituito da uno zucchero a 5 atomi di carbonio (desossiribosio nel DNA e ribosio nell'RNA) al quale è legata una delle quattro basi azotate e un gruppo fosfato.

In accordo con il modello proposto da Watson e Crick, la molecola di DNA è costituita da due catene polinucleotidiche tenute insieme da legami idrogeno tra le coppie di basi in modo da formare una doppia elica.



Dal DNA alla proteina: il ruolo dell'RNA

Secondo quello che Watson e Creek hanno definito come il “**dogma centrale della biologia**”, la sequenza delle basi azotate contenute nel DNA determina la sequenza degli amminoacidi di una proteina, attraverso due processi consecutivi definiti **trascrizione** e **traduzione**, mediati dall'RNA.

L'**RNA**, o acido ribonucleico, è una molecola chimicamente simile al DNA, ma è a singolo filamento e possiede alcune differenze nella struttura degli zuccheri e delle basi azotate che lo compongono. Inoltre, a differenza del DNA che si trova essenzialmente nel nucleo della cellula, l'RNA si trova soprattutto nel citoplasma, ed è qui che avviene la maggior parte della sintesi proteica.

Il DNA determina l'RNA che, a sua volta, determina le proteine. Questo processo è monodirezionale, infatti, il genotipo (DNA) determina il fenotipo dettando la composizione delle proteine. Tuttavia, le proteine non alterano il genotipo; cioè, non rimandano le istruzioni al DNA.

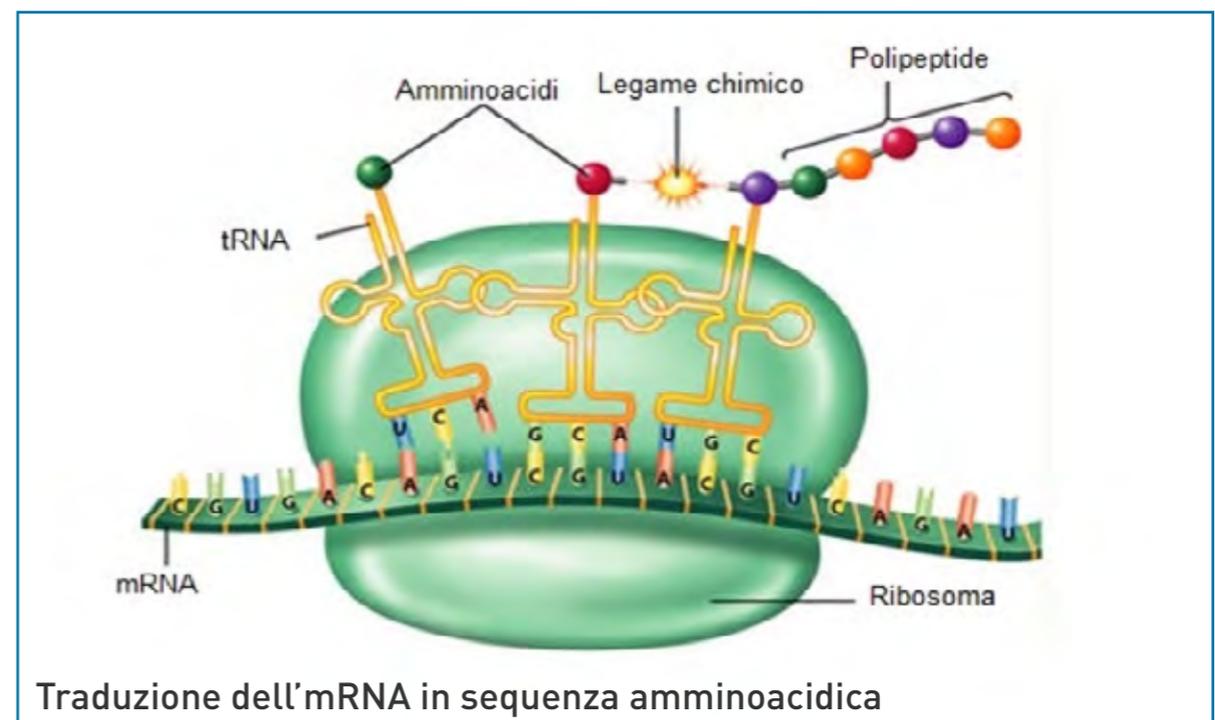
Trascrizione. La trascrizione è il processo in cui un singolo filamento di DNA viene copiato nella forma di RNA da un enzima specifico (**RNA polimerasi**) che produce un filamento complementare a quello del DNA che viene così chiamato trascritto primario. Una volta ottenuto, quest'ultimo è sottoposto a una serie di processi di modificazione per ottenere l'RNA maturo definito RNA messaggero (**mRNA**).



Traduzione. Una volta costituito, l'mRNA maturo viene veicolato nel citoplasma, dove funge da stampo per la **sintesi proteica** nel processo chiamato **traduzione**, che avviene nel ribosoma. La sequenza nucleotidica del gene viene tradotta in sequenza amminoacidica di una proteina tramite una codifica specifica definita **codice genetico**. Ogni gruppo di tre nucleotidi consecutivi dell'RNA (tripletta o codone) fornisce le istruzioni per un amminoacido.

Dato che gli amminoacidi sono venti, mentre le combinazioni possibili dei tre nucleotidi sono 64 ($4^3 = 4$ nucleotidi per 3 elementi), alcuni amminoacidi possono essere codificati da triplette differenti e per questo motivo si dice che **il codice è ridondante**.

La traduzione dell'mRNA in proteina coinvolge delle molecole adattatrici che riconoscono sia il codone (tripletta di basi azotate) dell'mRNA, sia l'amminoacido corrispondente presente nel citoplasma. Queste molecole sono chiamate RNA transfer (**tRNA**) e permettono di veicolare gli amminoacidi alle triplette corrispondenti e legarli tramite un legame peptidico per formare la catena amminoacidica che costituisce la struttura primaria della proteina.

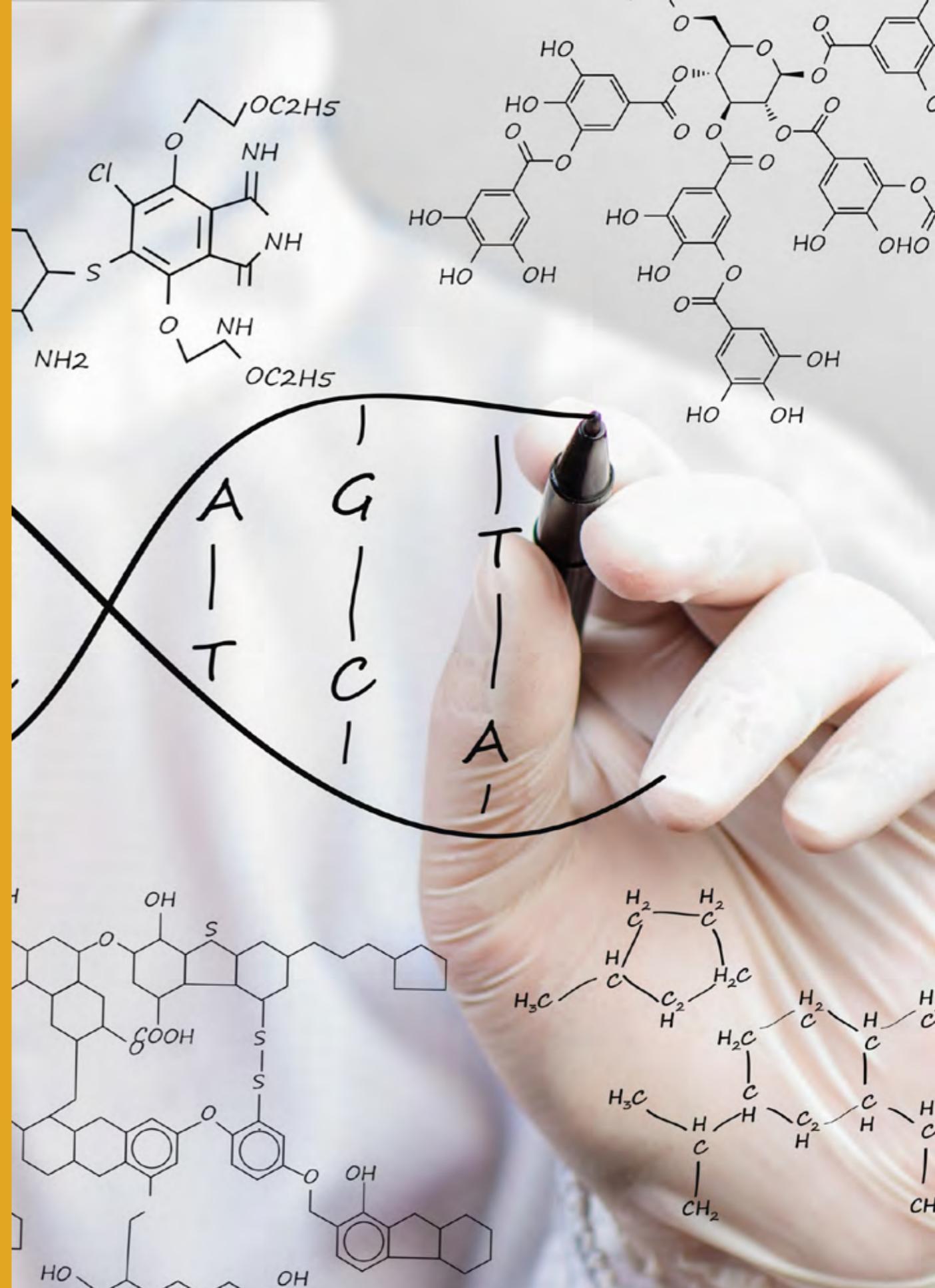


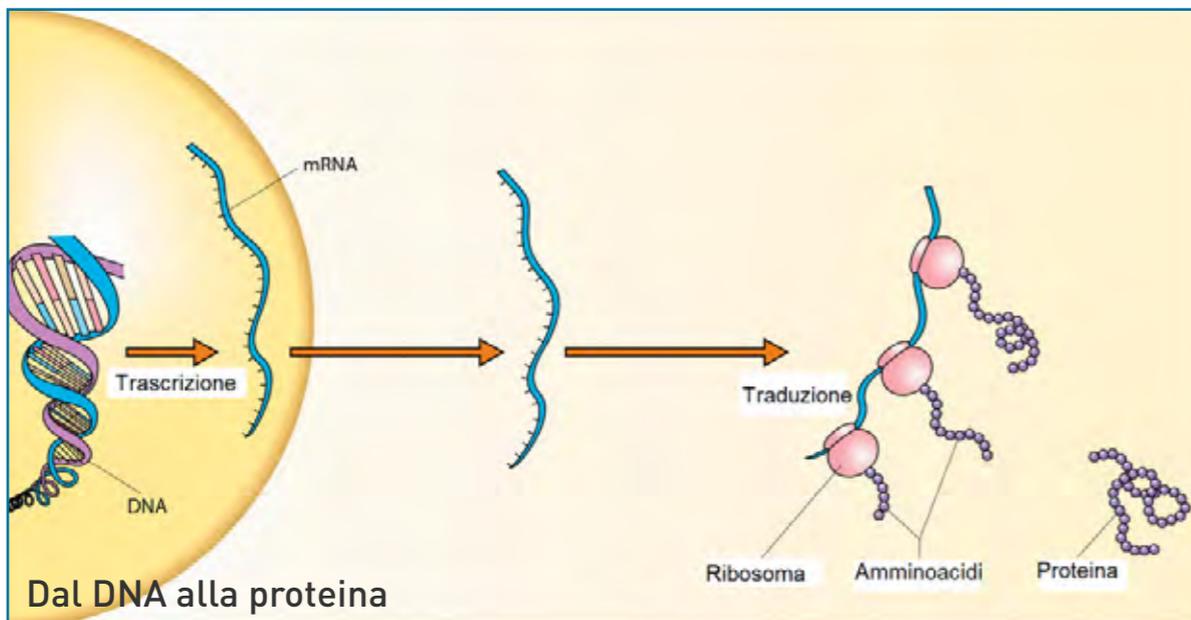
CHE COSA SONO TRASCRIZIONE E TRADUZIONE?

La trascrizione è il processo attraverso il quale sequenze di basi nel DNA vengono trascritte in sequenze di basi nell'RNA.

La traduzione dell'mRNA in una catena proteica avviene a livello dei ribosomi.

Gli amminoacidi sono trasportati al ribosoma mediante molecole di tRNA che si legano al codone complementare dell'mRNA, favorendo l'allungamento della catena polipeptidica.





Questo processo avviene all'interno di una struttura specifica chiamata **ribosoma**. La proteina di nuova sintesi viene allungata progressivamente mantenendo la corrispondenza codone/amminoacido fino a quando verranno incontrati dei codoni di terminazione (UAA, UAG o UGA), detti anche di arresto o stop, che segnalano la fine del messaggio che codifica per la proteina. La proteina una volta formata andrà incontro a processi di maturazione e sarà poi utilizzata per le sue funzioni biologiche.

Cosa succede quando cambiamenti del DNA portano alla formazione di proteine con funzione alterata

Nel 1901 il biologo olandese **H. De Vries** ideò la teoria delle mutazioni o mutazionismo, secondo la quale in ogni specie vegetale o animale avvengono una serie di variazioni ereditarie (mutazioni) della struttura del materiale genetico, spontanea o indotta da agenti mutageni fisici o chimici. Ciascuno di questi cambiamenti può avere un effetto benefico, innocuo o nocivo e la loro conservazione o meno è soggetta a selezione naturale.

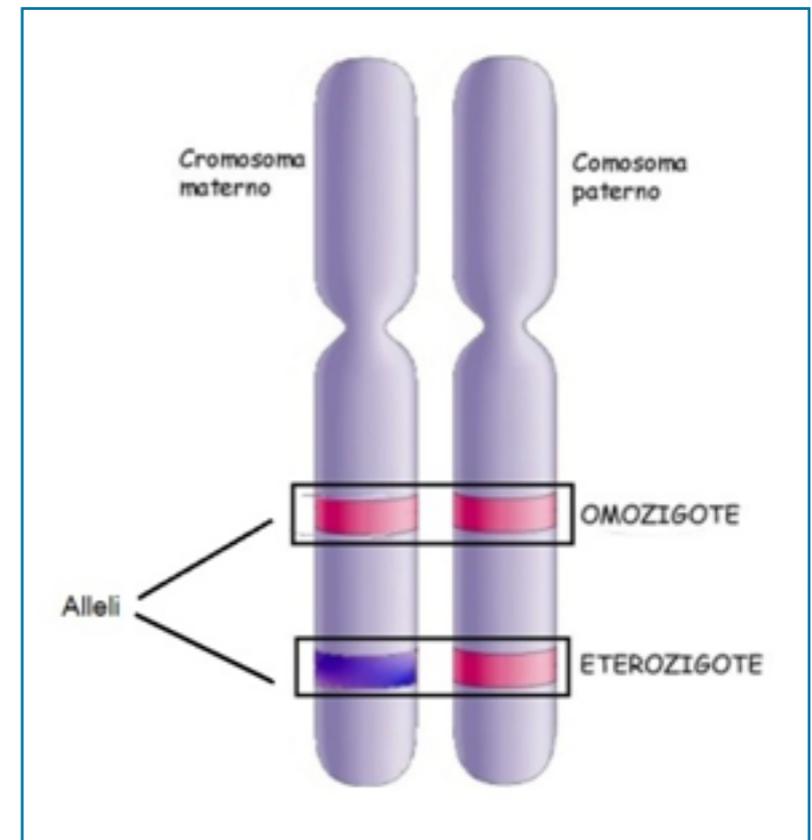
Negli organismi pluricellulari si riconoscono due tipi di mutazioni: quelle **somatiche**, che si trasmettono alle cellule figlie ma non vengono ereditate dalla prole; e le mutazioni delle cellule **germinali**, ovvero le cellule specializzate nella produzione dei gameti che, in seguito alla fecondazione, verranno trasmesse al nuovo organismo.

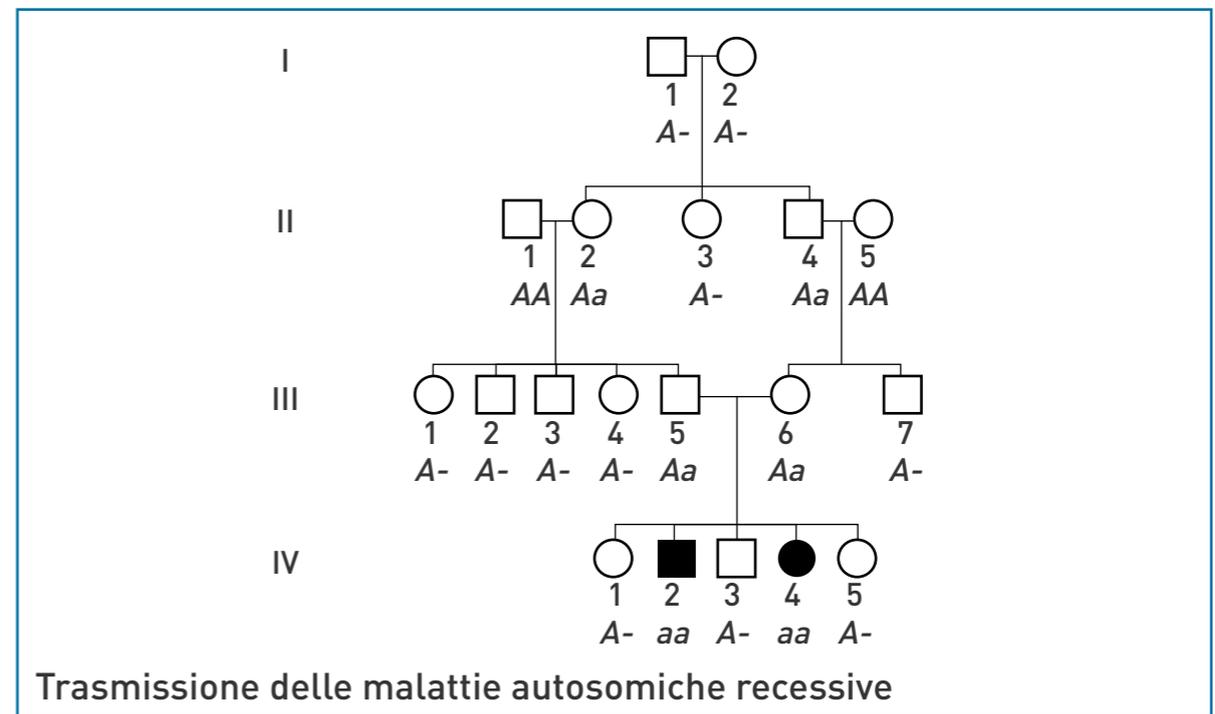
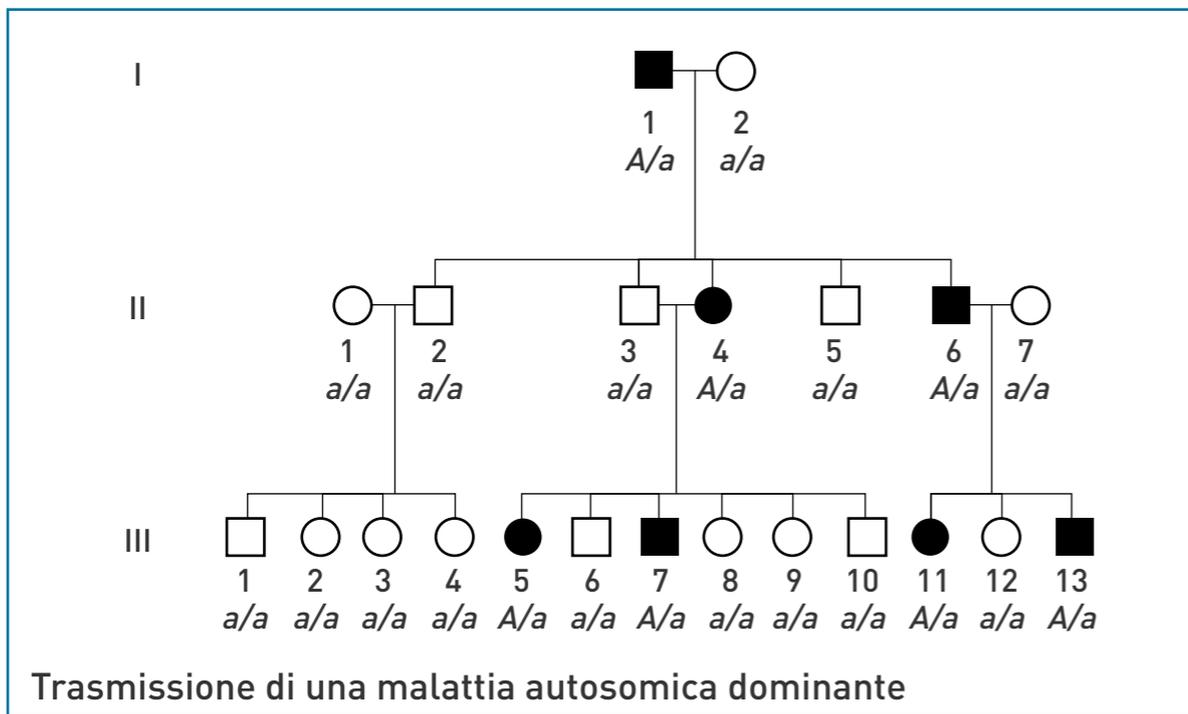
Negli anni, il concetto di mutazione è stato applicato a tutte le variazioni ereditarie del DNA, qualunque sia l'effetto che esse determinano nel fenotipo. Le mutazioni possono interessare ampie porzioni di DNA, ma anche un singolo nucleotide.

Dalla mutazione del DNA alla malattia genetica

Le variazioni del DNA che provocano un cambiamento della struttura di una proteina possono determinarne l'aumento, la riduzione o la perdita della funzionalità. Dal punto di vista clinico, questi cambiamenti sono responsabili della comparsa di **malattie monogeniche**, perché legate alla mutazione di un singolo gene.

Le malattie monogeniche rientrano nella categoria più ampia delle malattie genetiche, che includono anche le **malattie genetiche cromosomiche** (come la sindrome di Down), **genomiche** (dovute alla perdita o all'acquisizio-





ne di un discreto numero di geni), **multifattoriali** o **complesse** (dovute all'effetto additivo di alcuni geni e dell'ambiente) e **mitocondriali** (originare dalla mutazione del cromosoma circolare presente nel mitocondrio).

La comparsa del fenotipo clinico di una malattia genetica risente di due fattori importanti. Il primo è dipendente dal numero di alleli mutati. Esistono malattie genetiche in cui basta un solo allele mutato perché compaia il fenotipo clinico. In questo caso

si parla di malattia autosomica dominante: il fenotipo clinico compare sia nei soggetti con un solo allele mutato (eterozigoti) che con entrambi gli alleli mutati (omozigoti). La malattia compare generalmente nell'età adulta e si manifesta con maggiore gravità nei soggetti omozigoti.

Esempi di malattie autosomiche dominanti sono: la **corea di Huntington**, una malattia neurodegenerativa che colpisce la coordinazione muscolare e porta a un declino cognitivo e a proble-



mi psichiatrici dovuta ad una mutazione della proteina chiamata huntingtina; l'amiloidosi ereditaria da transtiretina (**amiloidosi hATTR**), un'altra malattia neurodegenerativa, in cui la mutazione TTR può condurre alla sintesi di forme instabili della proteina, che successivamente si possono accumulare come fibrille amiloidotiche a livello di varie strutture organiche, interferendo con la loro normale funzione; l'**ipercolesterolemia familiare**, causata da mutazioni nei geni che codificano per proteine chiave nel metabolismo del colesterolo LDL.

Accanto alle malattie autosomiche dominanti esistono le malattie autosomiche recessive che si manifestano solo negli individui con entrambi gli alleli mutati (omozigoti). Gli individui eterozigoti sono portatori sani della malattia, in quanto pur non avendo manifestazioni, possono trasmettere una copia dell'allele mutato alla prole. Un esempio di malattia recessiva è l'**anemia falciforme**, dovuta a un difetto nell'emoglobina. Gli individui omozigoti per l'allele recessivo associato alla malattia presentano globuli rossi con la caratteristica forma a falce che rende difficoltosa la loro circolazione. Gli individui eterozigoti producono sia globuli rossi normali che globuli anormali e presentano disturbi meno gravi degli omozigoti recessivi. Un altro esempio di malattia autosomica recessiva è l'**Atrofia Muscolare Spinale (SMA)**, una patologia neuromuscolare caratterizzata dalla progressiva morte dei motoneuroni, le cellule nervose del midollo spinale che impartiscono ai muscoli il comando di movimento. Un secondo aspetto importante che può determinare il differente fenotipo clinico di una malattia monogenica è la localizzazione della mutazione all'interno del gene. Infatti, mutazioni nello stesso gene possono portare a fenotipi più o meno gravi di malattia.

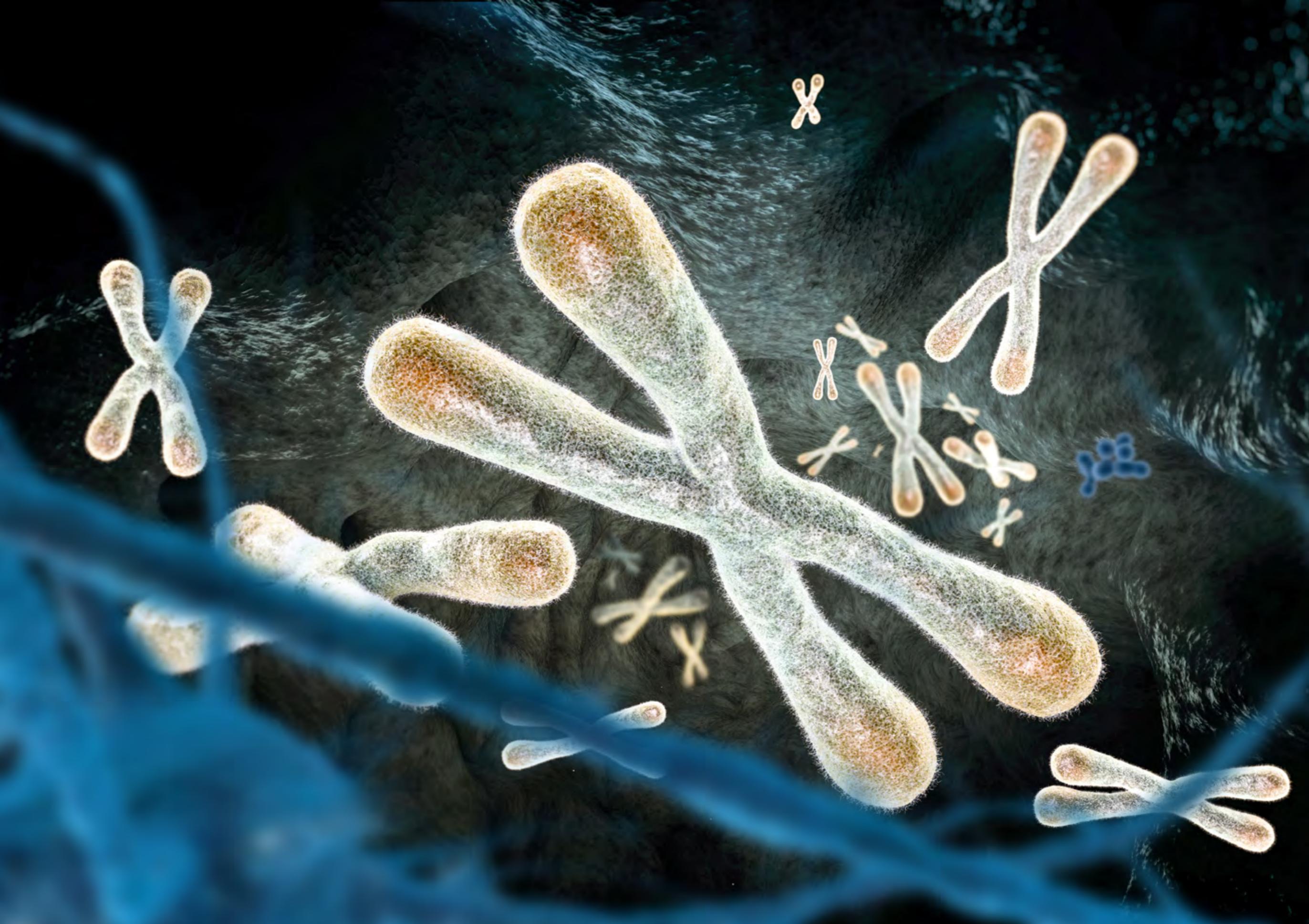
La conoscenza delle basi molecolari delle malattie genetiche è quindi fondamentale per formulare strategie terapeutiche innovative volte a correggere il difetto genico o a eliminare il prodotto del DNA aberrante e quindi controllare l'mRNA.

CHE COSA SONO LE MUTAZIONI?

La mutazione è un processo che determina un cambiamento a livello del DNA. Le variazioni del DNA che provocano un cambiamento della struttura di una proteina possono determinarne l'aumento, la riduzione o la perdita della funzionalità.

Esistono malattie genetiche in cui basta un solo allele mutato perché compaia il fenotipo clinico. In questo caso si parla di malattia autosomica dominante.

Accanto alle malattie autosomiche dominanti esistono le malattie autosomiche recessive che si manifestano solo negli individui con entrambi gli alleli mutati (omozigoti).



COME AGIRE SUL DNA



Due modi per agire sui geni e i loro prodotti: modificare il DNA o eliminare l'mRNA

Modificare il DNA: terapia genica e DNA editing

Uno dei progressi più importanti della ricerca biomedica negli ultimi decenni è consistito nella capacità di studiare le basi genetiche associate a una malattia attraverso le moderne strategie di sequenziamento. Questo ha permesso di identificare le diverse mutazioni del DNA che si associano in maniera causale a una determinata malattia.

Questa osservazione ha anche posto le basi per studiare strategie volte a:

- 1) inserire una sequenza di DNA codificante per la proteina funzionale mancante o difettosa
- 2) sostituire il DNA mutato con la sequenza genica originale.

Nel primo caso parliamo di terapia genica, che a oggi ha ottenuto risultati importanti come quelli per il trattamento dell'immunodeficienza severa combinata, dovuta a difetto di adenosina deaminasi (ADA-SCID), che hanno portato nel 2016 all'approvazione di Strimvelis, un farmaco innovativo in questo settore. Nel secondo caso parliamo di strategie per correggere il DNA mutato (DNA editing) ed è un campo di intensa attività di ricerca sperimentale.

Terapia Genica

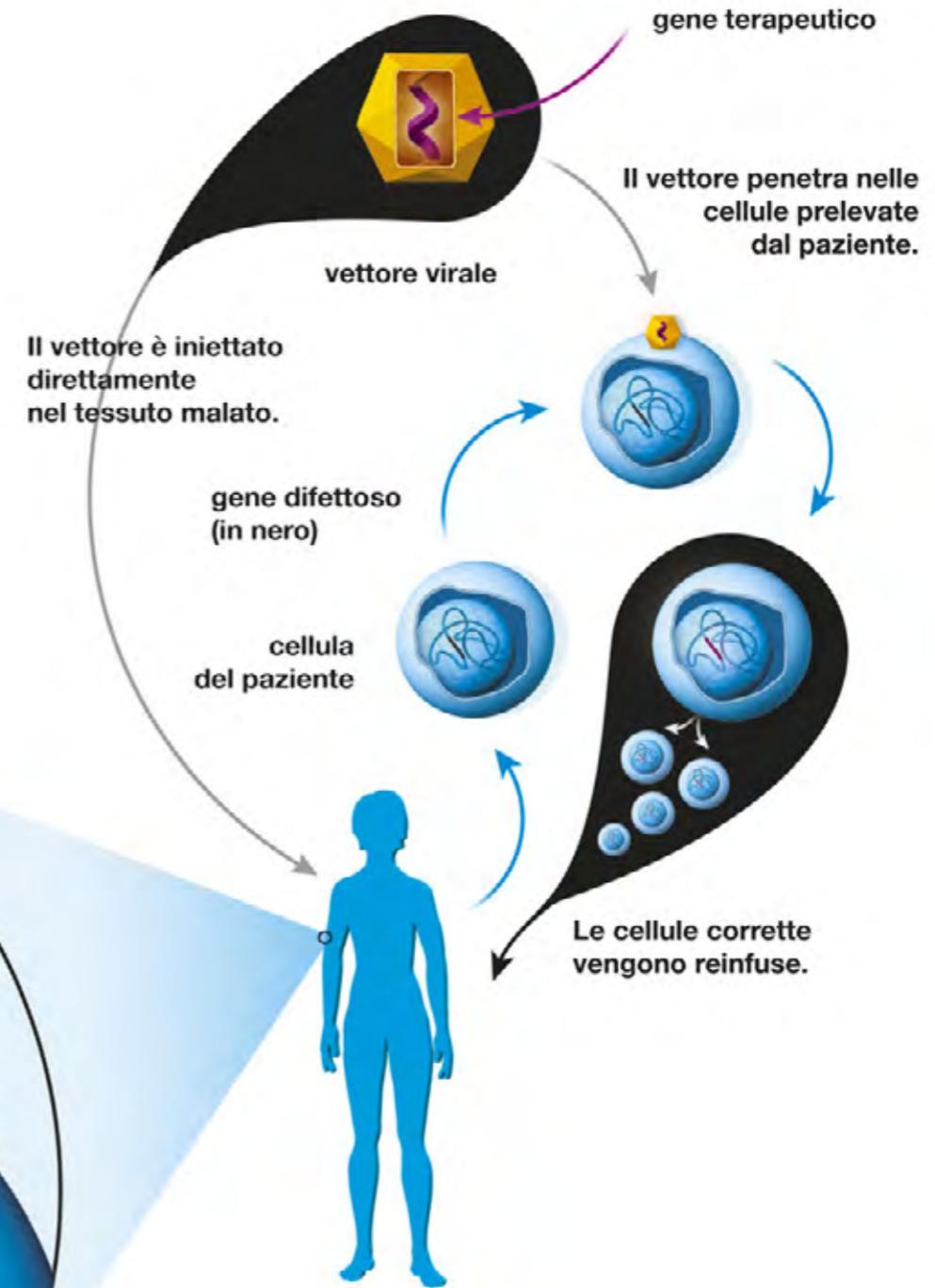
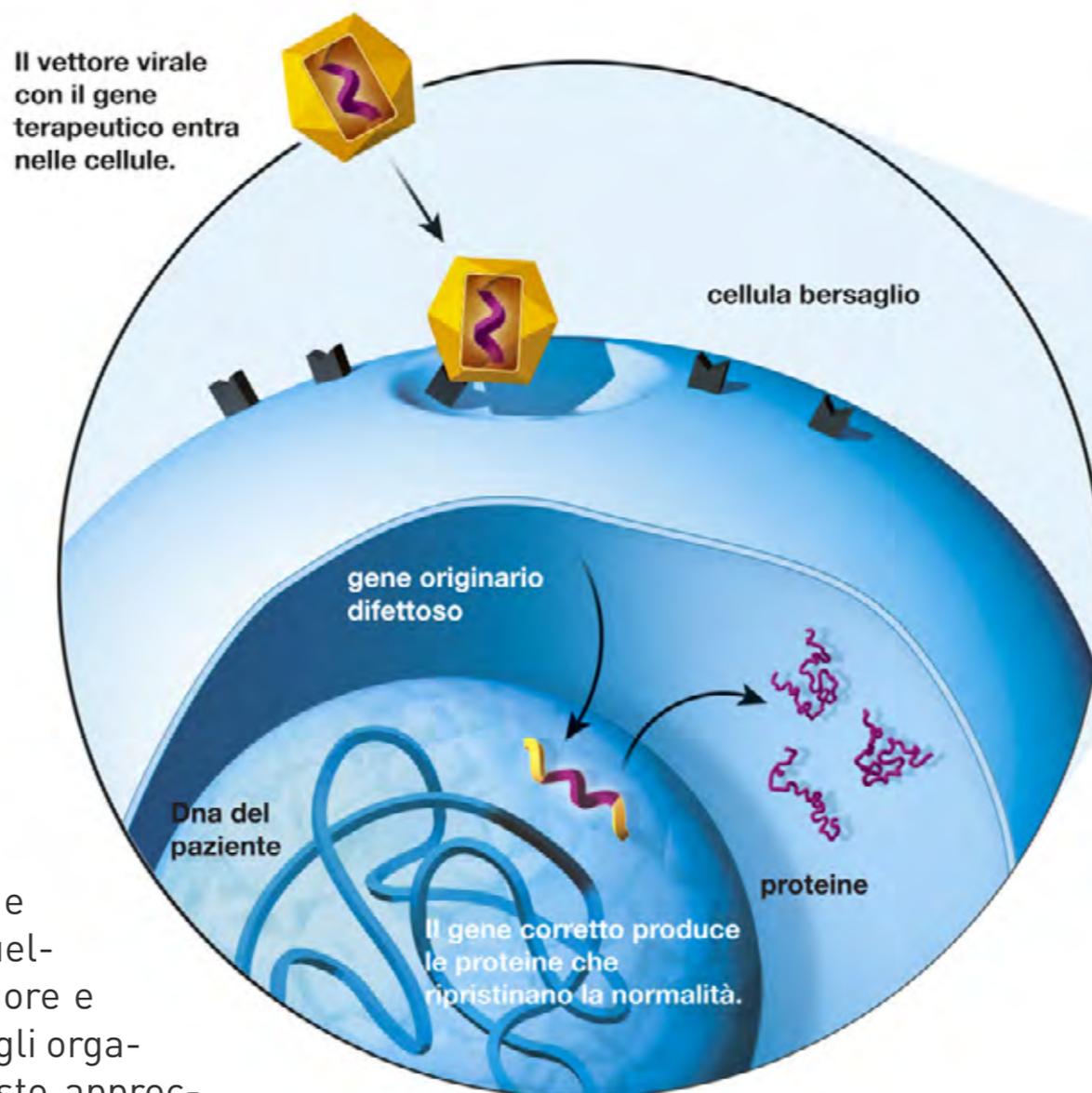
Le strategie di terapia genica si basano sulla possibilità di inserire le informazioni per la codifica della proteina funzionante attraverso l'utilizzo di un vettore di tipo virale in grado di integrare nel genoma del paziente l'informazione corretta.



Due principali metodi possono essere utilizzati per il trasferimento di geni: la terapia genica *ex vivo* e *in vivo*. Nel trasferimento *ex vivo* si trasferiscono geni clonati in cellule autologhe, ovvero dello stesso individuo, per evitare che esse vengano rigettate dal sistema immunitario del paziente trattato. In particolare le cellule vengono espianate, selezionate per l'espressione del gene inserito, amplificate e infine reintrodotte nel paziente. Questo metodo è applicabile ai soli tessuti che possono essere prelevati dal corpo, modificati geneticamente e reintrodotti nel paziente, dove attecchiscono e sopravvivono per un

lungo periodo di tempo, come ad esempio le cellule del sistema ematopoietico e della pelle. Tale procedura è sicuramente lunga e costosa ma permette di selezionare e amplificare le cellule d'interesse e gode di una elevata efficienza.

La terapia genica *in vivo* viene attuata in tutti quei casi in cui le cellule non possono essere messe in coltura o prelevate e reimpiantate, come quelle del cervello o del cuore e della maggior parte degli organi interni. Inoltre, questo approccio rappresenta un modello terapeutico



Terapia genica.

A sinistra: il vettore virale, con il gene terapeutico, penetra nelle cellule. Il gene si attiva e produce le proteine che ripristinano la normalità. A destra: il vettore può essere iniettato direttamente nel tessuto da curare (*in vivo*), oppure in cellule prelevate dal paziente e poi re-infuse (*ex vivo*).

co con elevata compliance e più economico del precedente ma, attualmente, di più difficile applicazione. In questo caso il gene d'interesse viene inserito nell'organismo, tramite un opportuno vettore, direttamente per via locale o sistemica.

Generalmente, per ottenere buoni risultati, si utilizzano vettori virali, cioè virus ingegnerizzati in modo da fargli trasportare il gene terapeutico e inserirlo nelle cellule bersaglio.

DNA editing

Gli approcci farmacologici volti a modificare il DNA hanno inizialmente sfruttato la ricombinazione del DNA e sono basati sul meccanismo di "crossing-over". Questo processo è responsabile della ricombinazione dei caratteri genetici al concepimento e contribuisce alle differenze fenotipiche tra familiari.

Idealmente è possibile costruire una struttura di DNA esogena che contenga alle estremità sequenze simili a quelle presenti sul corredo genomico in modo che avvenga uno scambio tra la sequenza naturale e quella introdotta.

La ricombinazione omologa "spontanea" basata su questo meccanismo avviene con bassissima frequenza, nell'ordine di 1 ogni milione. Quindi il numero di cellule dove la ricombinazione avviene è limitato e nonostante tecniche di arricchimento della frazione modificata si è lontani da un impiego negli esseri umani. Il motivo della scarsa efficacia è legato all'impossibilità, sino a pochi anni fa, di tagliare il DNA in modo selettivo e aumentare l'efficienza dello scambio di DNA.

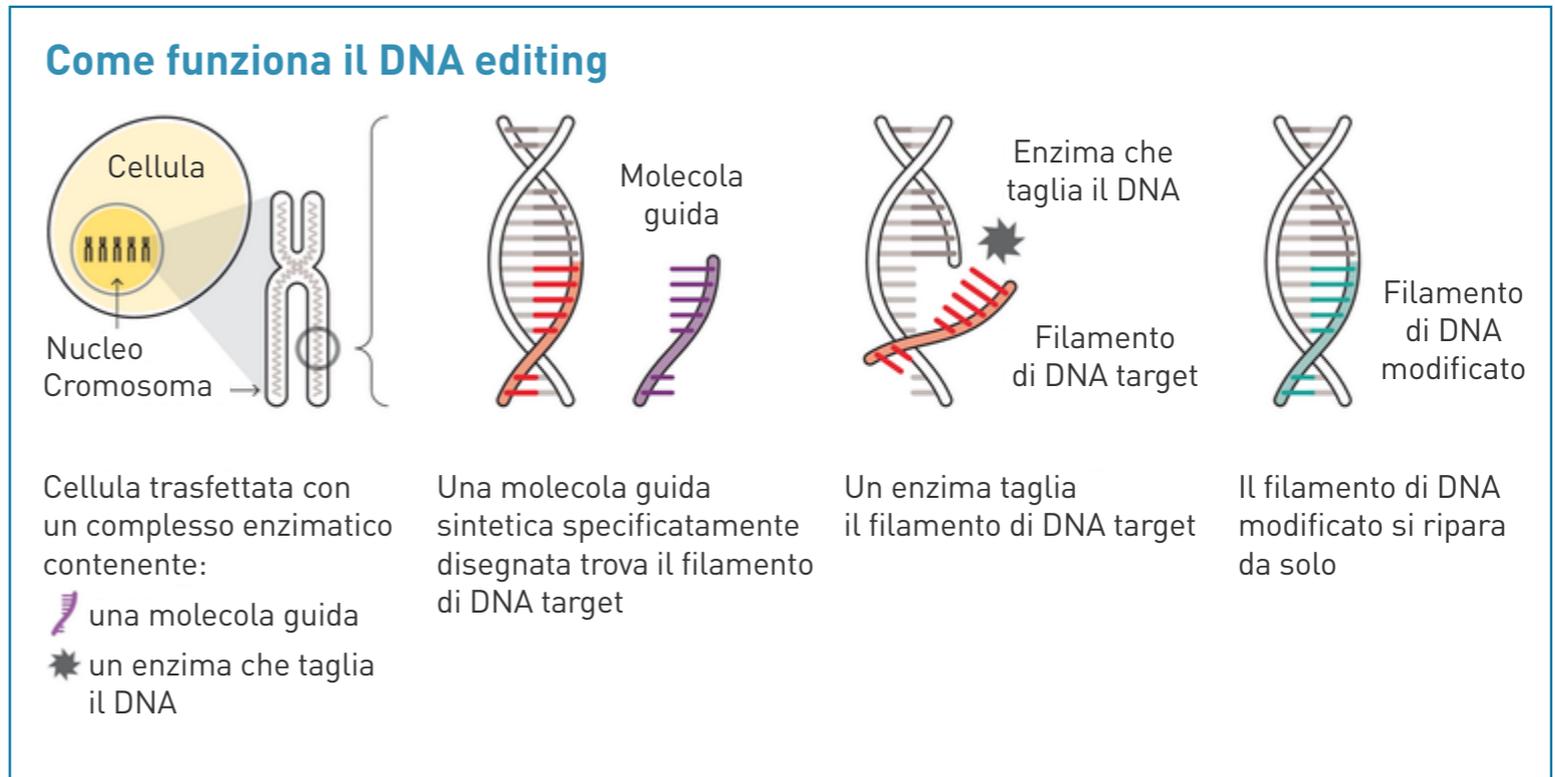


Questi problemi sono stati superati di recente con l'introduzione del sistema CRISPR-Cas9. Si tratta di un complesso costituito dalla proteina Cas9 e una sequenza di RNA e trae origine da un meccanismo di immunità adattativa che i batteri hanno conservato per riconoscere e proteggersi da DNA esogeno.

Questo approccio permette di:

- 1) eliminare una sequenza di DNA
- 2) introdurre o correggere una mutazione
- 3) inserire una sequenza di DNA
- 4) attivare o reprimere l'espressione di un gene.

Questo approccio presenta ad oggi alcune limitazioni ed è legato anche ad aspetti etici e alla necessità di un'attenta valutazione del bilancio rischio/beneficio.



COME AGIRE SULL'RNA



ELIMINARE L'RNA: SMALL INTERFERING RNA (siRNA) E OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSO (ASO)



Mentre la terapia genica e il DNA editing hanno come obiettivo quello di modificare il DNA, esiste anche la possibilità di agire sull'RNA attraverso l'approccio di silenziamento genico che permette di modulare in maniera rapida ed efficace l'espressione di mRNA e di conseguenza l'espressione e la funzione del suo prodotto senza modificare il DNA.

L'utilizzo farmacologico di questo meccanismo fisiologico si basa sulla possibilità di effettuare un'ibridizzazione di una sequenza di acidi nucleici a un mRNA target favorendone la degradazione prima che avvenga la traduzione a proteina. Agendo direttamente sull'mRNA e non sul DNA genomico, si va a eliminare il prodotto di un gene (RNA) senza cambiare il codice genetico come nel caso della terapia genica, ponendo quindi meno problemi dal punto di vista della sicurezza.

I vantaggi di agire sull'RNA

Silenziare l'RNA aumenta in maniera importante il numero e la tipologia di target che possono essere bersagliati a scopi terapeutici. Infatti, è possibile disegnare molecole dirette contro sequenze di RNA che codificano per proteine strutturali o fattori di trascrizione, ma anche verso RNA non codificanti ma comunque coinvolti in processi fisiopatologici come i microRNA.

Ciò che rende molto interessante l'approccio di silenziamento genico sono la potenza, la specificità, oltre alla facilità di disegno e sintesi del composto che sarà poi utilizzato. Le implicazioni sono molto importanti e in teoria qualsiasi gene collegato a una determinata patologia potrebbe essere 'bersagliato'.

Questo ha portato in pochi anni all'utilizzo del silenziamento genico in ambito clinico, con il primo farmaco basato su questo approccio approvato dalla Food and Drug Administration statunitense già nel 2013.

Il grosso ostacolo a uno sviluppo ancora più rapido delle terapie basate sul silenziamento genico è rappresentato dalla capacità di guidare la molecola selettivamente verso un tessuto o una cellula.

Ad oggi il fegato rappresenta l'organo che può essere bersagliato con più facilità, sia perché una volta in circolo il farmaco raggiunge rapidamente il fegato, ma anche grazie ad alcune modifiche chimiche sulla molecola che ne aumentano l'uptake da parte della cellula epatica.

Ad oggi esistono due strategie per il silenziamento genico che sono utilizzate negli studi clinici, gli small interfering RNA (siRNA) e gli oligonucleotidi antisenso (ASO).

Il meccanismo di interferenza dell'RNA (RNAi)

La tecnica di interferenza dell'RNA (RNAi) deriva dal concetto generale che un RNA, in presenza di una catena di RNA complementare, formi con questo un doppio filamento molto stabile. L'RNA a doppio filamento non viene tradotto e quindi viene abolita la sintesi proteica.

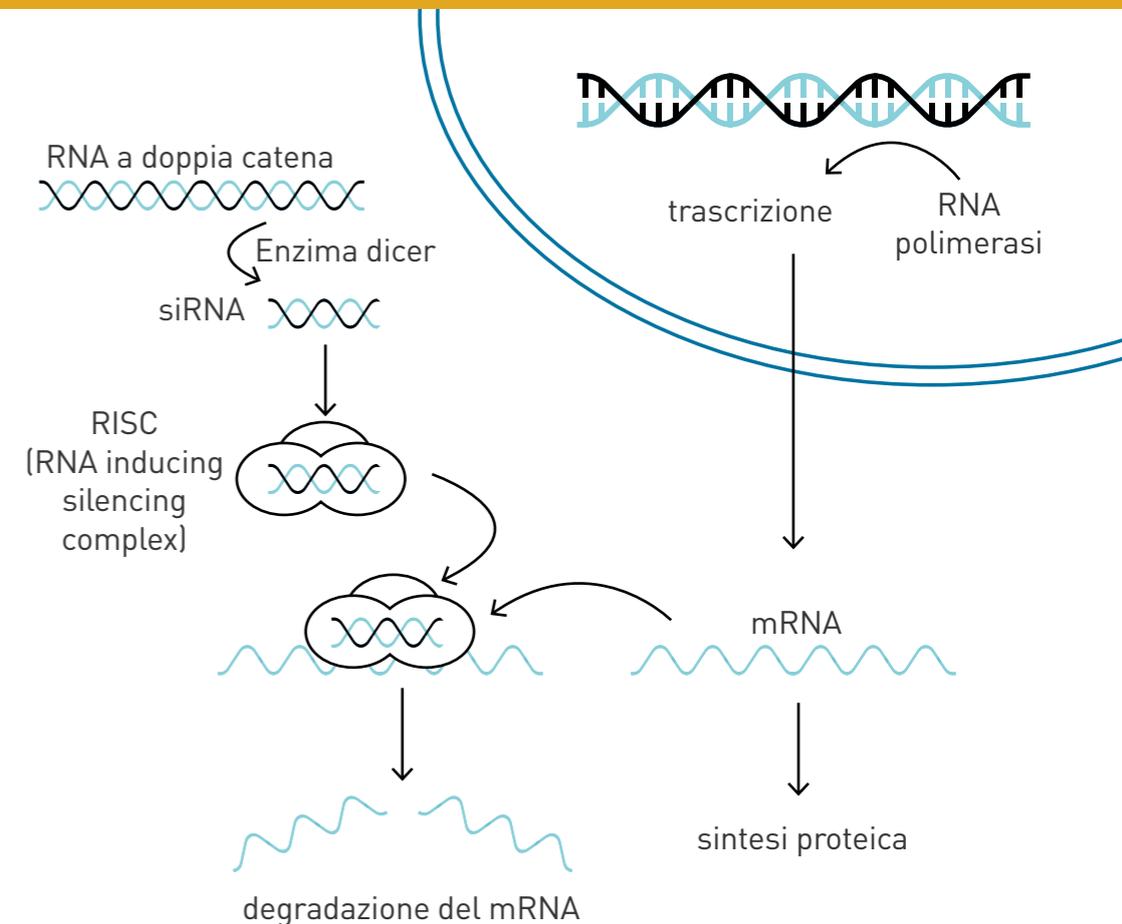
A metà degli anni '90 Andrew Fire, Craig Mello e i loro colleghi scoprirono

che l'esposizione di una cellula o anche di un organismo a sequenze di RNA a doppio filamento poteva portare al silenziamento di un gene in modo molto specifico ed efficace. Gli scienziati chiamarono questo processo interferenza dell'RNA (RNAi) e per questa scoperta furono insigniti del premio Nobel per la Fisiologia e la Medicina nel 2006.

L'interferenza dell'RNA è un processo fisiologico presente nei protozoi, nelle piante, nei funghi e nel regno animale, che si è conservato durante l'evoluzione come meccanismo di difesa innato per proteggere l'ospite contro virus a RNA potenzialmente pericolosi. Probabilmente l'RNA a doppio filamento ricorda alla cellula un genoma virale o un trasposone, un elemento trasponibile a vita indipendente presente talvolta nel genoma, che si autoreplica.

In presenza di un RNA a doppio filamento, l'organismo risponde producendo o attivando delle RNA endonucleasi (DICER), che tagliano l'RNA a doppio filamento in tratti di dimensioni più piccole. I piccoli filamenti di RNA (small interfering RNA, **siRNA**) si associano a un complesso specifico denominato RISC, che li guida verso l'RNA messaggero complementare, a cui si legano favorendone la degradazione. Il meccanismo è quindi un silenziamento post-trascrizionale.

Meccanismo d'azione dei siRNA





COSA SONO E COME FUNZIONANO I siRNA

I siRNA, o small interfering RNA, sono piccole molecole di RNA la cui funzione è quella di impedire l'espressione di geni che codificano per proteine alterate responsabili di determinate malattie.

I siRNA reprimono l'espressione di un gene legandosi all'RNA messaggero (mRNA) e inducendone la degradazione.

DA UN FIORE DI PETUNIA AL PREMIO NOBEL PER LA SCOPERTA DELL'RNA INTERFERENCE

Nel 2006, due ricercatori americani, Andrew Fire e Craig Mello, sono stati insigniti del premio Nobel per i loro studi sull'RNA interference, il meccanismo mediante il quale alcuni frammenti di RNA a doppio filamento sono in grado di interferire (e spegnere) l'espressione di alcuni geni.

Nella motivazione per l'assegnazione del premio era stato sottolineato che i due ricercatori avevano scoperto un processo fondamentale per il controllo della trasmissione delle informazioni genetiche.

L'effetto RNA interference si era osservato per la prima volta in alcune piante di petunia, nelle quali era stato inserito un transgene responsabile della pigmentazione dei fiori, per ottenere petunie più scure.

Il transgene codificava per una proteina uguale a quella già presente nelle piante. Il risultato ottenuto fu inatteso, dal momento che le petunie non presentavano un colore più scuro, ma risultavano screziate e qualche individuo era completamente bianco. Si era ottenuta quindi una ridotta espressione sia del gene endogeno che del transgene introdotto nelle piante durante gli esperimenti. Si ipotizzò dunque che c'era stato qualcosa che aveva "spento" o reso inattivo il gene responsabile del colore dei fiori.

Questo fenomeno va sotto il nome di silenziamento genico post trascrizionale.

Fire e Mello scoprirono che un RNA a doppio filamento promuoveva la degradazione dell'RNA messaggero, che dunque non era più in grado di "recapitare" il gene (nel caso della petunia quello che dava il colore più scuro). L'effetto RNAi è probabilmente un meccanismo molto antico di difesa contro le infezioni da virus a RNA.



Applicazioni cliniche del silenziamento genico mediante siRNA

Anche se il trattamento con RNAi mima l'inibizione farmacologica di una proteina target da parte di un farmaco classico, quest'approccio fornisce numerosi vantaggi rispetto ai farmaci tradizionali o altri biologici (anticorpi, proteine terapeutiche, peptidi e vaccini).

Infatti, tutte le proteine, anche quelle considerate non 'bersagliabili' con i farmaci tradizionali o biologici, possono essere controllate attraverso l'RNAi, dato che ogni trascritto che codifica una proteina, che causa o contribuisce alla malattia, può essere silenziato attraverso questo approccio.

Inoltre, diversi farmaci biologici, pur essendo molto specifici, per la loro struttura possono incontrare difficoltà a raggiungere il sito bersaglio, soprattutto se localizzato all'interno delle cellule.

Pertanto l'RNAi offre una maggiore specificità e flessibilità rispetto ai farmaci tradizionali, dato che l'unico requisito chiave

per il suo disegno è ottenere una sequenza di circa 20 nucleotidi in grado di appaiarsi all'RNA target.

Oggi le competenze acquisite nel campo della bioinformatica permettono di disegnare strutture opportune per silenziare un determinato gene. In parallelo, la facilità di sintesi di queste molecole le ha rese molto interessanti nella terapia di numerose condizioni patologiche ad oggi di difficile intervento attraverso approcci farmacologici classici.

Infatti, il meccanismo dell'RNAi ha moltissime applicazioni nel campo della ricerca biomedica e nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche. Per quanto riguarda le applicazioni in campo sperimentale, l'utilizzo di RNAi su uno specifico gene permette di eliminarne l'espressione in linee cellulari o in modelli sperimentali e valutare gli effetti sulla fisiologia cellulare o d'organo. Questi studi pongono le basi per silenziare, per esempio, proteine esogene prodotte in seguito a infezioni virali; in questo campo, l'RNAi è stato utilizzato con successo per silenziare la



produzione di proteine esogene da parte del virus HIV, i virus di epatite B ed epatite C.

Il campo di applicazione più importante, però, è legato alla possibilità di curare le malattie genetiche rare associate alla produzione di una proteina alterata. Diversi sono gli studi clinici nei quali si sta valutando l'efficacia dei siRNA e in particolare riguardano il trattamento di alcune patologie rare quali amiloidosi, porfiria, emofilia e ipercolesterolemia.

Farmacologia dei siRNA

L'applicazione clinica dei siRNA ha dovuto superare difficoltà legate a profili farmacocinetici e di bio-distribuzione sfavorevoli quando somministrati sistemicamente.

Infatti, i siRNA tal quali hanno un'emivita molto bassa in quanto vulnerabili all'azione delle endonucleasi, andando incontro a rapida degradazione ed eliminazione. Inoltre, possono dare problemi di specificità, risultando nel silenziamento aspecifico o nell'attivazione del sistema immunitario innato.

Sono quindi stati utilizzati metodi differenti per ovviare a queste difficoltà, tra cui modificazioni chimiche dei siRNA e/o utilizzo di sistemi di distribuzione che possono aumentare la specificità d'azione del siRNA.

Questo è stato ottenuto in un primo momento mediante l'utilizzo di nanoparticelle lipidiche in grado di proteggere i siRNA dall'azione delle endonucleasi e dalla clearance renale e permettere il raggiungimento della cellula bersaglio. La via di somministrazione è quella dell'infusione endovenosa. Queste nanoparticelle, grazie alla loro ridotta dimensione, riescono ad attraversare l'endotelio vascolare del fegato; in seguito a endocitosi, le nanoparticelle si fondono con la membrana endosomiale determinando il rilascio dei siRNA nel citoplasma, dove possono espletare la loro attività inibitoria.



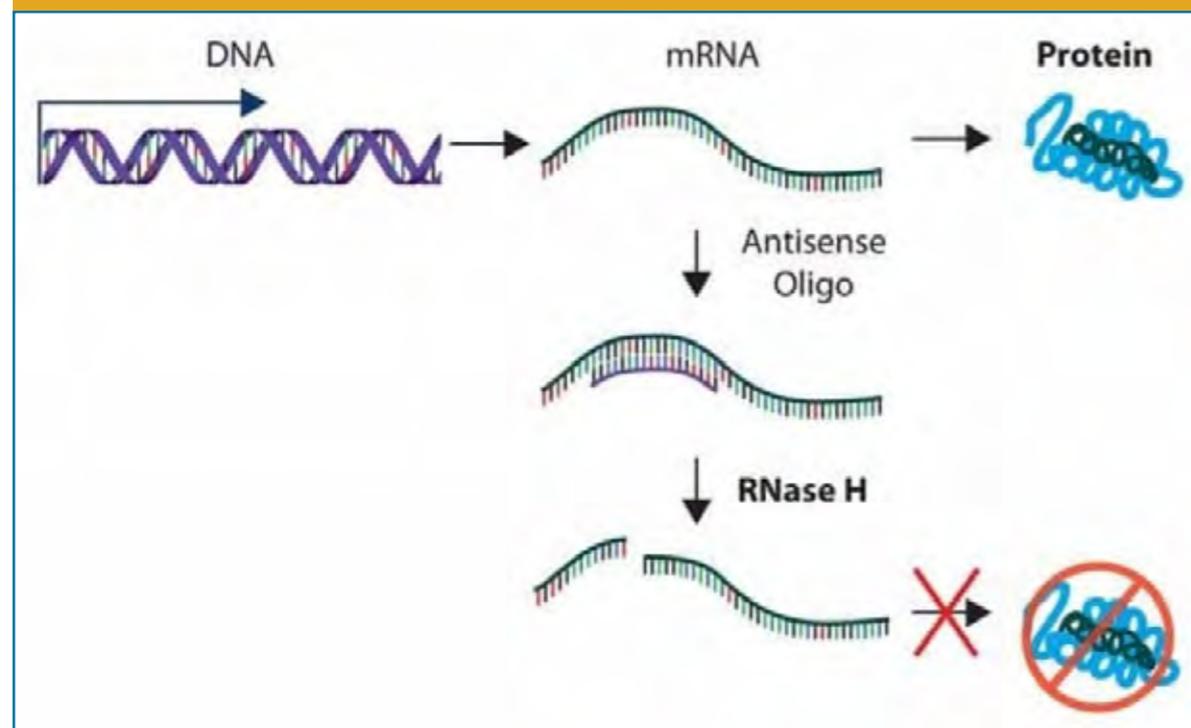
Questo tipo di approccio ha quindi permesso di aumentare notevolmente la biodisponibilità dei siRNA, anche se rimangono delle questioni importanti da definire. Si è cercato quindi di sviluppare un sistema che permetta la somministrazione sottocutanea dei siRNA.

Un approccio testato ha permesso di coniugare i siRNA con residui di carboidrati che permettono di veicolarli selettivamente negli epatociti. Questi composti hanno una elevata stabilità, sono resistenti all'azione delle nucleasi e hanno una farmacocinetica migliore rispetto ai siRNA non coniugati; queste caratteristiche determinano un duraturo e robusto silencing dell'mRNA target nel fegato.

Oligonucleotidi antisenso (ASO)

La forma più semplice di acido nucleico con potenziale funzione terapeutica è rappresentata da corte molecole di DNA a singolo filamento, solitamente da 15 a 100 nucleotidi, sintetizzate

Meccanismo degli oligonucleotidi antisenso (ASO)



chimicamente. L'utilizzo di questi oligonucleotidi si basa sulla proprietà intrinseca del DNA a singolo filamento di appaiarsi in maniera specifica a un altro filamento di DNA o di RNA avente sequenza complementare.

Al fine di inibire selettivamente l'espressione di un gene cellulare o virale, può essere utilizzato un oligodeossinucleotide, ovvero una molecola di DNA tipicamente composta da 17-22 nucleotidi, avente una sequenza complementare all'mRNA del gene di interesse. Una volta introdotto nella cellula, l'ASO si appaia specificamente all'mRNA bersaglio, ne blocca la traduzione a livello del ribosoma e ne stimola la degradazione da parte di enzimi cellulari aventi la proprietà di RNasi H, ovvero capaci di degradare gli ibridi DNA/RNA.

Farmacologia degli oligonucleotidi antisenso

Le proprietà farmacocinetiche degli ASO sono legate alla chimica della loro struttura principale e sono indipendenti dalla specifica sequenza. Una volta in circolo, gli ASO si legano alle proteine plasmatiche che ne controllano la biodisponibilità, la filtrazione glomerulare e in ultimo l'eliminazione per via urinaria.

Dopo somministrazione per via sottocutanea, gli ASO sono distribuiti velocemente dal sito di iniezione verso il sangue, con concentrazioni plasmatiche che raggiungono il picco nell'arco di 3-4 ore. La distribuzione all'interno delle cellule avviene altrettanto velocemente ed è mediata da specifici meccanismi di endocitosi.

Viceversa, l'assorbimento nella circolazione sistemica dopo somministrazione orale, intravitreale o polmonare è generalmente inferiore all'1% della dose somministrata.

L'eliminazione degli ASO è facilitata da nucleasi che tagliano l'oligonucleotide in piccoli frammenti, non più in grado di legare in

CHE COSA SONO GLI ASO

Gli ASO, o oligonucleotidi antisenso, sono brevi molecole a singolo filamento di DNA complementari a una determinata sequenza. La sequenza a cui si legano è solitamente una molecola di RNA messaggero (mRNA) che, legata da un ASO specifico, non è più in grado di essere tradotta in proteina.

misura efficace le proteine plasmatiche, che vengono successivamente filtrati ed eliminati attraverso le urine.

La potenziale tossicità degli ASO può essere classificata in quella che è conseguenza del meccanismo d'azione (ibridizzazione con l'RNA) e quella indipendente. Nel primo caso vengono incluse le risposte legate a eccessivo effetto farmacologico oppure dovute a ibridizzazione a un RNA diverso da quello target. Questo tipo di tossicità è simile a quella che si potrebbe riscontrare con altre molecole e può essere minimizzato effettuando una selezione accurata dell'RNA target e una attenta caratterizzazione del profilo farmacologico e tossicologico in modelli preclinici.

Un'altra causa di tossicità è rappresentata dalla possibilità che l'oligonucleotide venga riconosciuto da proteine del sistema immunitario scatenando una risposta che può portare ad attivazione del sistema del complemento e della coagulazione. Più recentemente, diversi trials clinici con ASO hanno fatto emergere la comparsa di trombocitopenia che ha interessato dal 20% fino al 60% dei pazienti trattati, che ha portato all'interruzione del trattamento. È interessante notare come questo effetto collaterale è indipendente dalla sequenza target, ma piuttosto legato alla chimica degli ASO. Questa osservazione lascia spazio alla formulazione di ASO con caratteristiche chimiche differenti volte a minimizzare questo importante effetto collaterale.



AMILOIDOSI



Amiloidosi ereditaria da accumulo di transtiretina (hATTR)

Panoramica sulla malattia

L'**amiloidosi hATTR** è una malattia ereditaria, rapidamente progressiva e pericolosa per la vita. È causata da mutazioni nel gene TTR che codifica per una proteina chiamata **transtiretina**. Queste alterazioni genetiche causano un accumulo di proteine piegate in modo anomalo come fibrille amiloidi in numerosi siti, tra cui nervi, cuore e tratto gastrointestinale.

La transtiretina è prodotta principalmente nel fegato ed è normalmente un agente di trasporto della proteina legante il retinolo, uno dei veicoli utilizzati per trasportare la vitamina A nell'organismo.

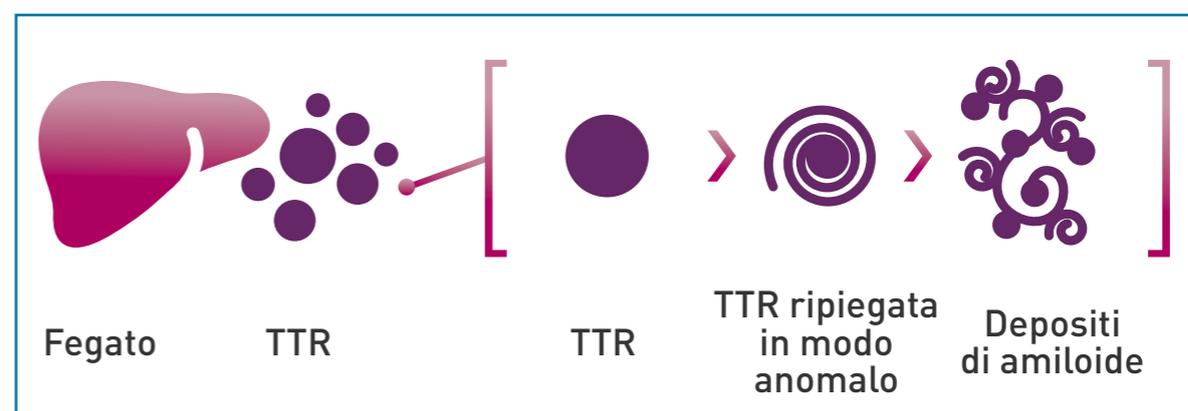
L'amiloidosi hATTR coinvolge numerosi sistemi nell'organismo e può portare a un'ampia varietà di sintomi, compresi sintomi sensoriali e motori, autonomici (ad es., diarrea, ipotensione, disfunzione erettile) e cardiaci.

Il continuum della malattia include pazienti che presentano prevalentemente sintomi di **polineuropatia** (che coinvolgono i nervi), storicamente noti come affetti da polineuropatia amiloidotica familiare (FAP), nonché pazienti che presentano prevalentemente sintomi di **cardiomiopatia** (che coinvolgono il cuore), storicamente noti come affetti da cardiomiopatia amiloidotica familiare (FAC). Tuttavia molti pazienti manifestano polineuropatia, cardiomiopatia e sintomi gastrointestinali.

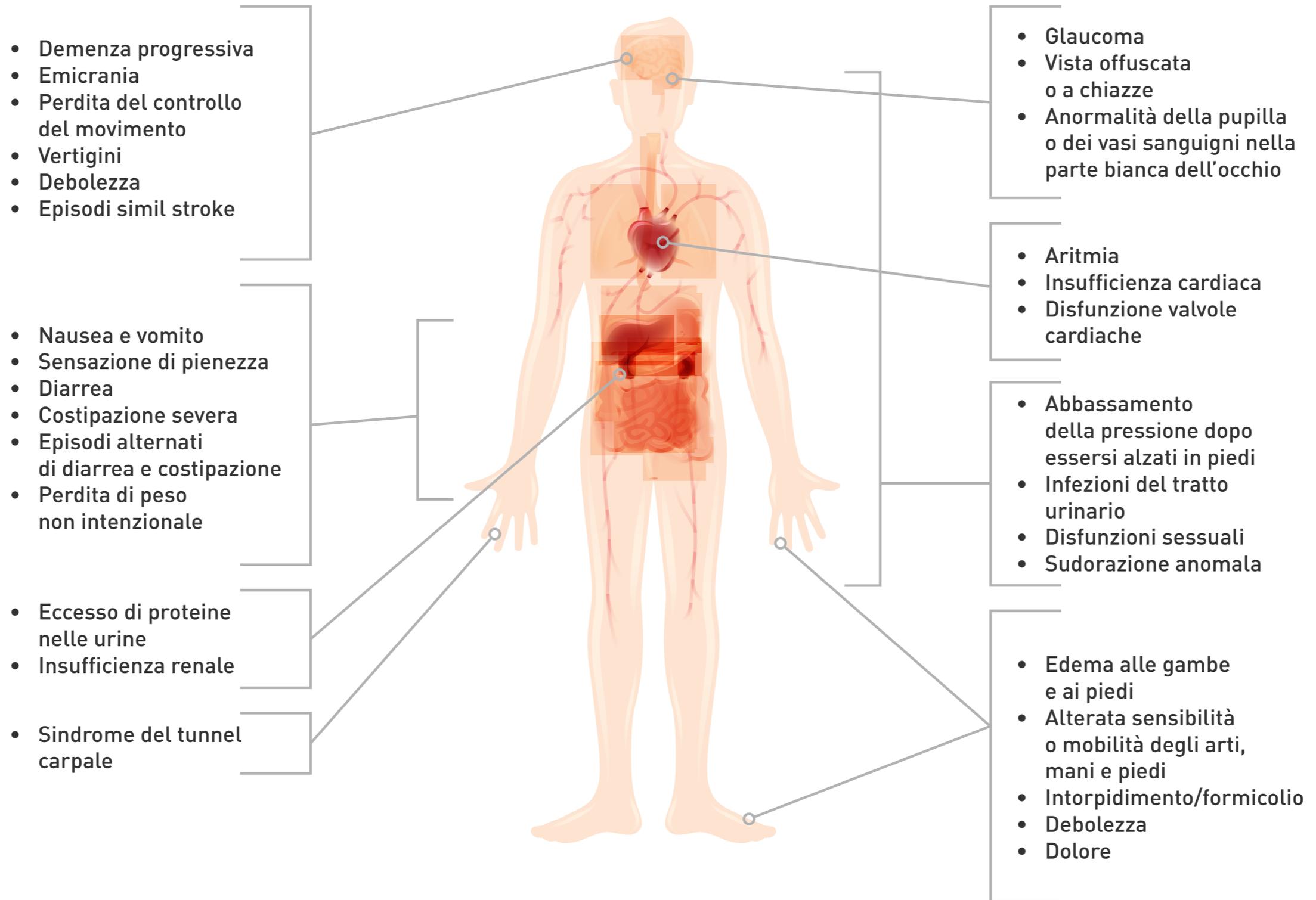
L'amiloidosi hATTR è un'importante necessità medica non soddisfatta che interessa circa **50mila persone nel mondo**. La condizione ha un decorso progressivo e può portare a morbidità, disabilità e, potenzialmente, a mortalità entro 2-15 anni dalla diagnosi. La malattia è spesso sotto-diagnosticata o diagnosticata erroneamente per la varietà dei sintomi che la caratterizzano e rimane dunque una notevole esigenza medica non soddisfatta per la mancanza di terapie che possano trattare la causa alla base della malattia.

Cause

L'amiloidosi hATTR è causata da una mutazione nel **gene TTR** ed è una malattia ereditaria, autosomica dominante. Ciò implica che una persona necessita di una sola copia del gene mutato per manifestare la malattia che può, pertanto, essere ereditata da un solo genitore. La mutazione porta la proteina TTR a piegarsi in modo anomalo, creando così un **accumulo di fibrille amiloidi** in numerosi organi. L'amiloidosi hATTR è associata a oltre 120 diverse mutazioni note nel gene TTR. La mutazione più comune associata alla polineuropatia è la V30M (Val30Met), che in Italia è responsabile di circa il 30% dei casi che si presentano prevalentemente con la polineuropatia.



Varietà dei sintomi dell'amiloidosi hATTR



Diagnosi

I pazienti affetti da amiloidosi hATTR richiedono una **diagnosi precoce** e accurata in considerazione della rapida progressione naturale della malattia. Dato che l'amiloidosi hATTR è spesso diagnosticata erroneamente a causa della miriade di sintomi che possono sovrapporsi ad altre malattie più comuni, i pazienti vengono spesso visti da numerosi specialisti prima di giungere a una diagnosi.

Poiché l'eziologia dell'amiloidosi hATTR è differente da quella di altre malattie con polineuropatia e cardiomiopatia, una diagnosi errata potrebbe portare a un trattamento inefficace o addirittura dannoso. La malattia deve essere considerata in pazienti affetti da neuropatia progressiva o cardiomiopatia con coinvolgimento multi-sistemico, specialmente in coloro che presentano un'anamnesi familiare di amiloidosi.

L'amiloidosi hATTR si può diagnosticare in vari modi; tuttavia, gli esami del sangue e la biopsia sono comunemente impiegati per confermare la presenza della proteina amiloide TTR. Possono essere inoltre utilizzati esami genetici per identificare la mutazione TTR specifica.

Altri esami diagnostici per l'amiloidosi hATTR con polineuropatia possono includere studi sulla conduzione dei nervi e/o esami della funzione renale. Possono essere utilizzati anche ecocardiogrammi, risonanza magnetica cardiaca e scintigrafia con traccianti ossei per aiutare a diagnosticare coloro che presentano sintomi predominanti di cardiomiopatia.



Prof. Giuseppe Vita

Amiloidosi da transtiretina: patogenesi, caratteristiche cliniche, diagnosi

 **GUARDA IL VIDEO**

Trattamenti

Le persone colpite da amiloidosi hATTR devono far riferimento a uno specialista della malattia per scegliere un piano di trattamento personalizzato. In base ai sintomi e al tipo di mutazione nel gene TTR, il **team multidisciplinare** di esperti per il trattamento del paziente può includere un neurologo, un cardiologo, un nefrologo, un internista e un gastroenterologo nonché altri professionisti del settore sanitario.

Attualmente, le uniche opzioni di trattamento approvate per la malattia allo stadio iniziale sono il trapianto di fegato e il tafamidis, uno stabilizzatore specifico della transtiretina. Il farmaco è approvato in Europa, Giappone e in alcuni paesi dell'America Latina. Le indicazioni del trattamento variano per ogni singolo paese: in Europa tafamidis è approvato per il trattamento dell'amiloidosi da transtiretina in pazienti adulti affetti da polineuropatia sintomatica in stadio 1, al fine di ritardare la compromissione neurologica periferica.

I trattamenti attuali per l'amiloidosi hATTR gestiscono i sintomi (trattamento di supporto) o cercano di stabilizzare la proteina. Pertanto, esiste una **significativa necessità di nuove terapie** che agiscano direttamente sulle cause alla base della malattia.

Negli ultimi anni sono oggetto di studio diverse nuove molecole. Quelle che hanno raggiunto la fase più avanzata di sperimentazione clinica (fase III) e per le quali è stata depositata la domanda di autorizzazione all'immissione in commercio alle agenzie regolatorie FDA ed EMA sono due: patisiran e inotersen.

PATISIRAN

Patisiran è una terapia basata sull'RNA interference (RNAi), che si somministra per via endovenosa una volta ogni tre settimane e che è stata sviluppata per il trattamento dell'amiloidosi hATTR con polineuropatia. Il farmaco ha come target l'RNA messaggero della

transtiretina ed è in grado di bloccare la produzione della proteina prima che quest'ultima si formi. Ciò può aiutare a eliminare i depositi di amiloide negli organi e nei tessuti periferici ripristinandone la funzione.

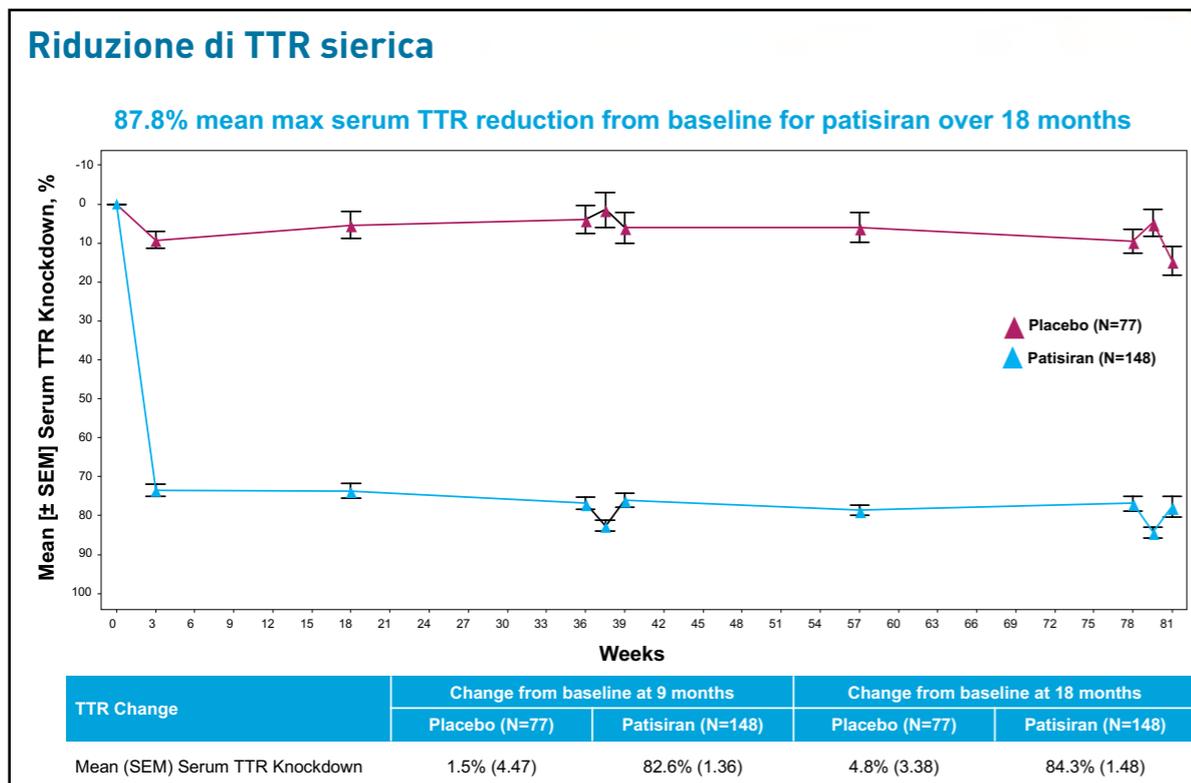


Lo studio di fase III APOLLO con patisiran

Disegno dello studio

APOLLO è uno studio di fase III randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, disegnato per valutare l'efficacia e la sicurezza di patisiran in pazienti affetti da amiloidosi hATTR con polineuropatia.

L'endpoint primario dello studio era la differenza tra i due trattamenti nella variazione del punteggio Neuropathy Impairment Score + 7 (mNIS+7) a 18 mesi. Gli endpoint secondari includevano: il punteggio della qualità della vita (Norfolk QOL-DN), la funzionalità motoria (NIS-W), la disabilità (R-ODS - Rasch-built Overall Disability Scale), l'indice di massa corporea modificato (mBMI), il test del cammino in 10 metri (10-MWT) e il punteggio del questionario COMPASS-31, sulla sintomatologia autonoma.



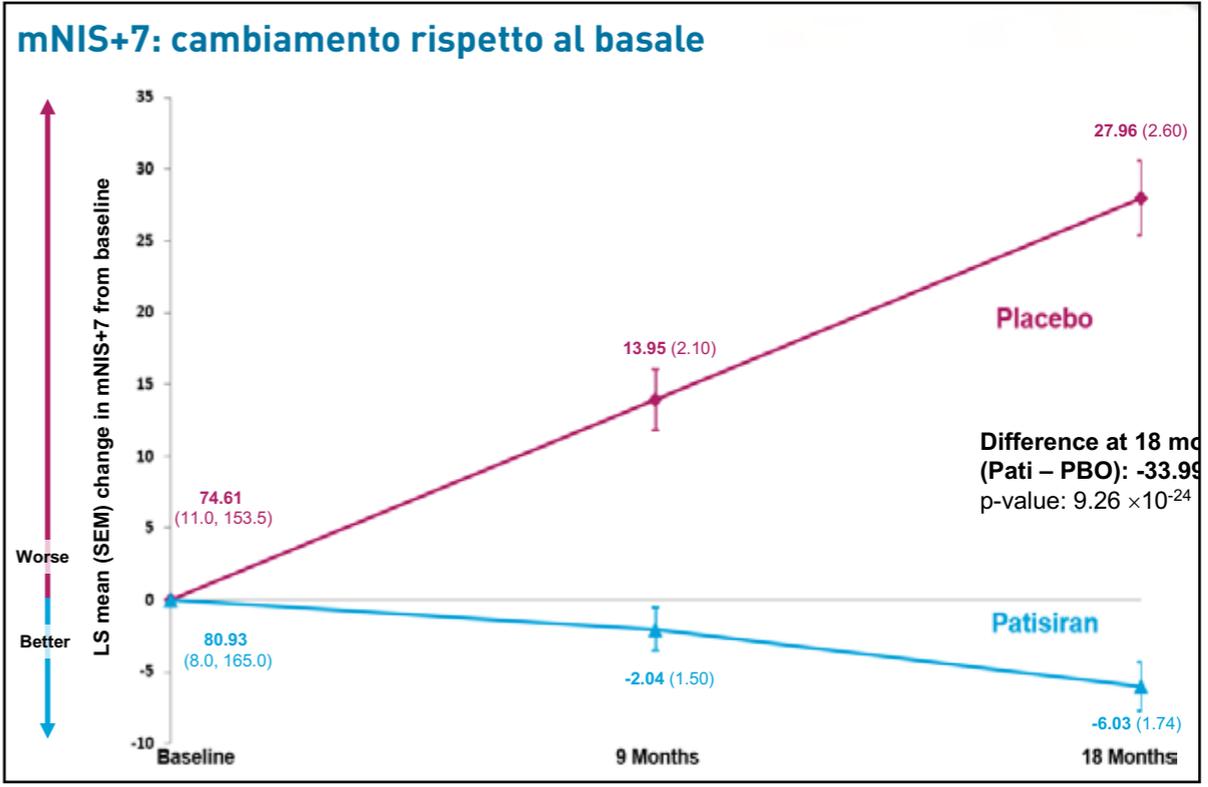


Nella sperimentazione sono stati arruolati **225 pazienti** con amiloidosi hATTR che sono stati randomizzati in rapporto 2:1 a patisiran o placebo, con patisiran somministrato alla dose di 0,3 mg/kg una volta ogni tre settimane per 18 mesi.

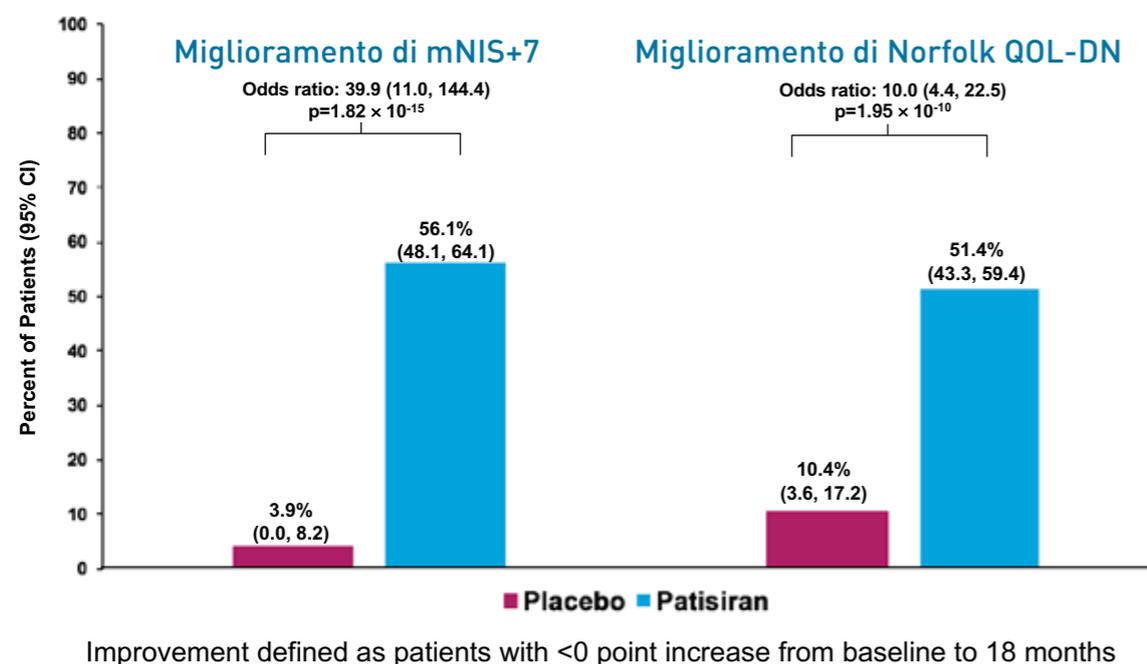
Risultati

I risultati completi dello studio APOLLO hanno dimostrato il miglioramento determinato da patisiran rispetto al placebo, a 18 mesi, nell'endpoint primario e negli endpoint secondari supplementari, comprendenti la sintomatologia neuropatica sensoriale, motoria e autonoma, nonché negli endpoint esplorativi cardiaci.

I pazienti hanno mostrato miglioramenti nella qualità della vita, nelle attività quotidiane, è migliorato lo stato nutrizionale, la forza motoria e la capacità deambulatoria, con una riduzione della sintomatologia soggettiva e delle disabilità. Gli effetti favorevoli di patisiran rispetto al placebo sono stati osservati in tutti i sottogruppi definiti su base demografica e sulla base delle caratteristiche dell'amiloidosi hATTR al basale.



mNIS+7 e Norfolk QOL-DNA: analisi binaria



 **GUARDA IL VIDEO**

Nella sottopopolazione cardiaca prespecificata, per alcuni endpoint esplorativi relativi ai biomarcatori cardiaci ed ecocardiografici sono stati osservati effetti positivi significativi di patisiran. Gli eventi avversi più comunemente segnalati, manifestatisi con maggiore frequenza nei pazienti trattati con patisiran, erano generalmente di grado da lieve a moderato e comprendevano ad esempio edema periferico e reazioni correlate all'infusione. La frequenza dei decessi e degli eventi avversi gravi è risultata simile nei gruppi patisiran e placebo.

Questi dati supportano il potenziale di patisiran di stabilizzare e persino migliorare le manifestazioni multisistemiche dell'amiloidosi hATTR, compreso il miglioramento nella qualità della vita dei pazienti.

INOTERSEN

Inotersen è un oligonucleotide antisenso sviluppato per il trattamento dell'amiloidosi hATTR, che si somministra per via sottocutanea una volta alla settimana. Il farmaco è stato disegnato per inibire la produzione di tutte le forme di transtiretina, quindi sia le forme anomale che la forma normale della proteina, offrendo un unico approccio per trattare tutti i tipi di amiloidosi.

Il 2 novembre 2017 sono stati presentati a Parigi, al primo meeting europeo sull'amiloidosi hATTR organizzato per pazienti e medici, i risultati completi dei due studi di fase III condotti per valutare la sicurezza e l'efficacia dei due farmaci in pazienti colpiti dalla malattia.

Lo studio di fase III NEURO-TTR su inotersen

NEURO-TTR è uno studio di fase III randomizzato, controllato con placebo, in doppio cieco, disegnato per valutare l'efficacia e la sicurezza di inotersen in pazienti con amiloidosi hATTR.

I risultati dello studio hanno dimostrato il miglioramento determinato da inotersen rispetto al placebo in entrambi gli endpoint primari, quali il Norfolk Quality of Life Questionnaire-Diabetic Neuropathy (Norfolk QoL-DN) e il modified Neuropathy Impairment Score +7 (mNIS+7), a 8 e 15 mesi di trattamento.

Benefici significativi e consistenti sono stati osservati in entrambi gli endpoint, indipendentemente dallo stadio di malattia, dal tipo di mutazione e dal trattamento precedente con farmaci stabilizzatori della proteina TTR o dalla cardiomiopatia.

I pazienti trattati con inotersen hanno mostrato anche un miglioramento della qualità della vita rispetto al placebo, con un cambiamento di 11,68 punti del Norfolk QoL-DN score a 15 mesi (cambiamento medio rispetto al basale = 0,99 vs 12,67, $p=0,0006$). Inoltre, è stato osservato un beneficio clinicamente significativo dovuto alla terapia rispetto al placebo in base alla valutazione della componente fisica del punteggio SF-36, una misura della salute generale e della qualità della vita. Nello studio, i pazienti trattati con il farmaco hanno mostrato un beneficio significativo nell'endpoint primario di controllo della malattia, mNIS+7, con un beneficio medio di 19,73 punti osservato a 15 mesi di trattamento rispetto al placebo ($P=0,00000004$).



Prof. Giampaolo Merlini

Amiloidosi da transtiretina: studi di fase III aprono nuove prospettive per i pazienti

 **GUARDA IL VIDEO**

PORFIRIA



Porfirie

Cosa sono e come si manifestano

Le **porfirie** sono un gruppo di malattie metaboliche dovute a deficit dell'attività di uno degli enzimi coinvolti nella via di biosintesi dell'**eme**, un complesso chimico facente parte della molecola di emoglobina in grado di legare ossigeno e altri composti. Il deficit di attività porta a un accumulo di molecole chiamate porfirine o dei loro precursori, che si depositano nei tessuti e vengono escreti nelle urine e nelle feci.

A seconda del difetto enzimatico presente, l'accumulo avviene in sedi diverse e diverse sono la via di eliminazione e la sintomatologia provocata.

Nella maggior parte dei casi, le porfirie sono **malattie ereditarie** causate da mutazioni nei geni che codificano per gli enzimi coinvolti nella biosintesi dell'eme. La trasmissione della malattia può verificarsi con modalità **autosomica dominante** (è sufficiente ereditare una copia alterata del gene da uno dei genitori per manifestare la malattia) oppure **autosomica recessiva** (occorre ereditare due copie alterate del gene da entrambi i genitori).

Le porfirie sono malattie con **espressività variabile** e bassa penetranza: la maggioranza degli individui (stimata in circa 80%) portatori di mutazioni per una porfiria autosomica dominante resta infatti asintomatica tutta la vita. Il manifestarsi della pato-



logia è causato dall'interazione di fattori genetici, ambientali e fisiologici.

I segni clinici della porfiria si manifestano solitamente nell'età adulta, ma, in alcuni casi, possono esordire durante l'infanzia.

Circa **5mila** persone negli Stati Uniti e in Europa presentano annualmente attacchi acuti di porfiria e circa mille persone presentano attacchi ricorrenti della malattia.

Esistono varie modalità di classificazione di queste malattie: tra le più usate ci sono quella che le divide in **porfirie epatiche** e **porfirie eritropoietiche** sulla base della sede di prevalente espressione del difetto enzimatico e quella che le classifica come porfirie acute e porfirie non acute sulla base della sintomatologia, cioè della possibilità di presentare "attacchi acuti" ricorrenti.

Forme acute

Le forme acute di porfiria includono: deficit di **ALA -deidratasi**, **porfiria acuta intermittente**, **coproporfiria ereditaria** e **porfiria variegata**. Queste patologie sono caratterizzate da coinvolgimento neurologico e i sintomi più comuni sono: dolori addominali e muscolari, febbre, vomito, astenia, perdita della sensibilità (iperestesi e parestesi), iponatriemia, instabilità emotiva, stitichezza, tachicardia e ipertensione.

Forme non acute

Le forme non acute di porfiria includono: **protoporfiria eritropoietica**, **porfiria eritropoietica congenita**, **porfiria cutanea tarda** e **porfiria epatoeritropoietica**. Queste patologie sono invece caratterizzate da sintomi esclusivamente cutanei tra cui, per esempio, fotofobia, ispessimento della pelle, formazione di bolle.

Tabella 1. Classificazione e caratteristiche cliniche delle Porfirie

Malattia	Classificazione	Difetto Enzimatico	Manifestazioni Cliniche Principali	Trasmissione	OMIM
Porfiria da deficit di ALA Deidrasasi (ADP)	ACUTA (Epatica)	ALAD	Attacchi acuti	AR	125270
Porfiria acuta intermittente (AIP)	ACUTA (Epatica)	PBGD	Attacchi acuti	AD	176000
Porfiria variegata (VP)	ACUTA (Epatica)	PPOX	Attacchi acuti Fragilità cutanea, lesioni bollose	AD	600923
Coproporfiria ereditaria (HCP)	ACUTA (Epatica)	CPOX	Attacchi acuti Fragilità cutanea, lesioni bollose	AD	121300
Porfiria eritropoietica congenita (CEP)	NON ACUTA (Eritropoietica)	UROS	Fragilità cutanea, lesioni bollose	AR	263700
Porfiria cutanea tarda (PCT)	NON ACUTA (Epatica)	UROD	Fragilità cutanea, lesioni bollose	Complessa	176090, 176100
Protoporfiria eritropoietica (EPP)	NON ACUTA (Eritropoietica)	FECH	Fotosensibilità acuta	Complessa	177000
Protoporfiria eritropoietica legata al cromosoma X (XLPP)	NON ACUTA (Eritropoietica)	ALAS	Fotosensibilità acuta	XD	300752

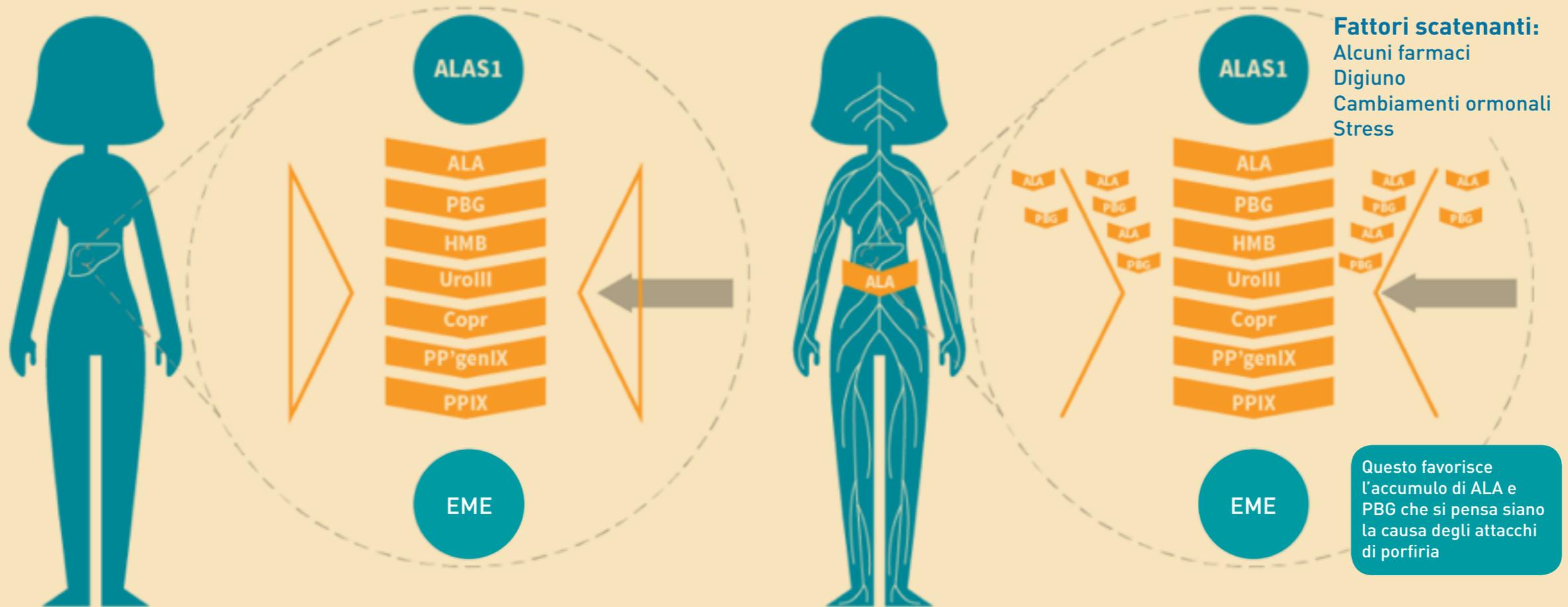
ALAD: 5-aminolevulinato deidrasasi; **PBGD:** porfobilinogeno deaminasi; **CPOX:** coproporfirinogeno ossidasi; **PPOX:** protoporfirinogeno ossidasi; **UROS:** uroporfirinogeno III sintasi; **UROD:** uroporfirinogeno decarbossilasi; **FECH:** ferrochelatasi; **ALAS:** 5-aminolevulinato sintasi. **AD:** autosomica dominante; **AR:** autosomica recessiva; **XD:** legata al cromosoma X dominante

Porfirie epatiche acute

Le porfirie epatiche acute comprendono: **porfiria da deficit di ALA Deidratasi (ADP)**, **porfiria acuta intermittente (AIP)**, **porfiria variegata (VP)** e **coproporfiria congenita (CEP)**.

Nelle persone con queste forme di malattia, uno degli otto enzimi coinvolti nella biosintesi dell'eme lavora al 50% della sua attività. La ridotta attività enzimatica può rimanere adeguata in

alcune circostanze ma la presenza di alcuni fattori scatenanti può indurre l'attività di amminolevulinato sintasi 1 (ALAS1), portando a un aumento dell'accumulo di acido aminolevulinico (ALA) e porfobilinogeno (PBG), gli intermedi tossici che si pensa siano responsabili del danno ai nervi e della sintomatologia specifica di queste malattie.



ALAS1 = amminolevulinato sintasi 1; ALA = acido aminolevulinico;
PBG = porfobilinogeno; HMB = idrossimetilbilano;

UroIII = uroporfirinogeno III; Copr = coproporfirinogeno III;
PP'genIX = protoporfirinogeno IX; PPIX = protoporfirina IX.

COME SI FA LA DIAGNOSI DI PORFIRIA?

La diagnosi può richiedere tempo, perché i primi sintomi delle porfirie sono poco specifici. In caso di sospetto, la conferma viene ottenuta con esami di laboratorio (esami del sangue, delle urine e delle feci).

In molti casi, inoltre, è possibile effettuare l'analisi genetica, ricercando le mutazioni responsabili nei geni coinvolti.

Ovviamente, la diagnosi precoce offre dei vantaggi: sarà, infatti, possibile prevenire l'insorgenza di attacchi acuti o iniziare, precocemente una cura.

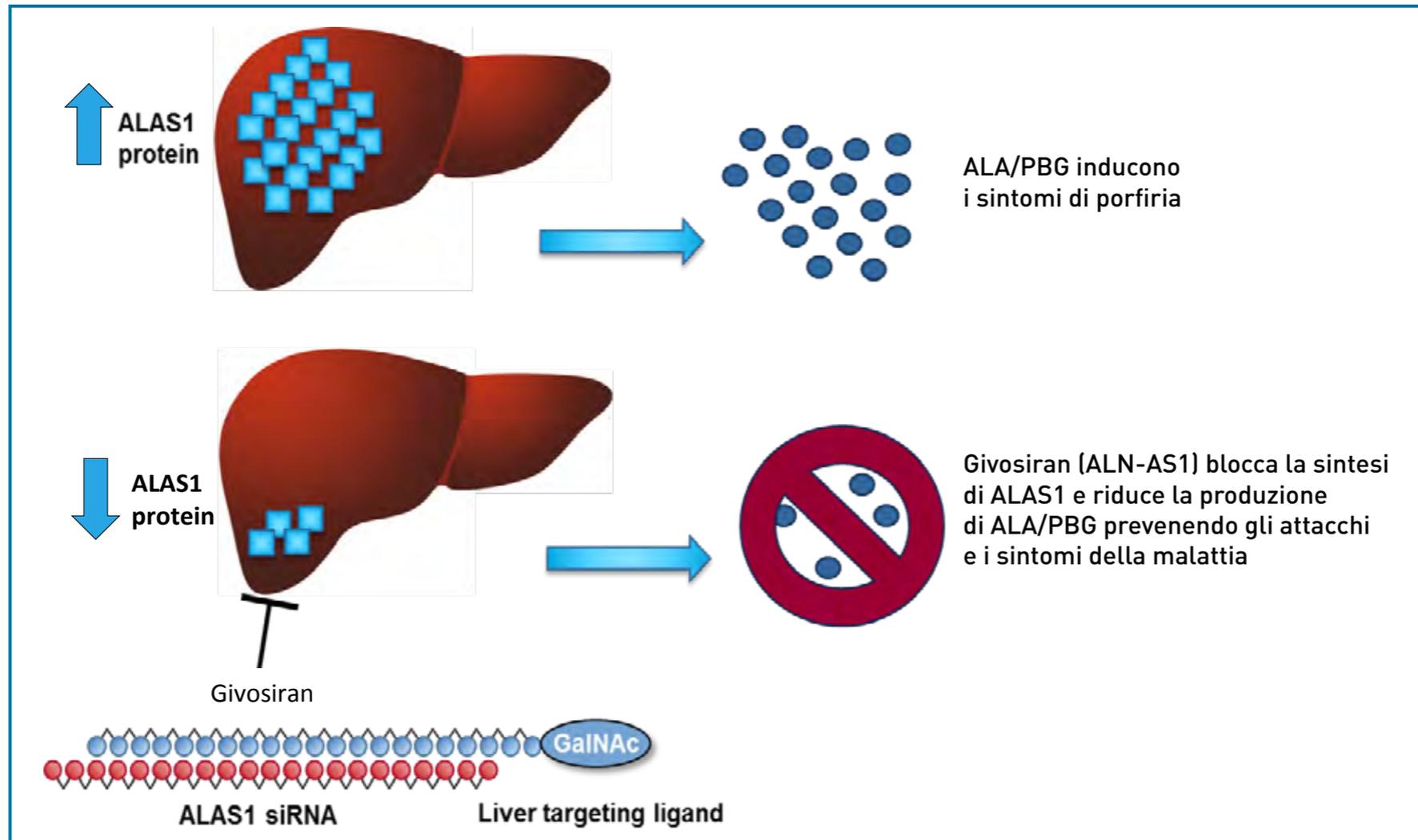
Terapia

Non esiste una cura risolutiva, ma sono possibili interventi dietetici, farmacologici o anche chirurgici (in alcuni casi è consigliabile il trapianto di midollo osseo), in grado di agire sui sintomi della malattia.

Le porfirie acute sono malattie che per manifestarsi necessitano dell'interazione di **fattori genetici, ambientali e fisiologici**. I più noti fattori scatenanti un attacco acuto sono rappresentati da farmaci, regimi alimentari ipocalorici, stress, alcool, fumo, ormoni, infezioni. Quindi, la principale indicazione da fornire al paziente consiste **nell'allontanamento di tutti i possibili fattori aggravanti la patologia** e in grado di indurre l'insorgenza di attacchi acuti. Inoltre, il paziente deve porre particolare attenzione a non assumere farmaci porfirinogenici. Ai soggetti affetti da queste malattie viene prescritto un regime alimentare con un adeguato apporto di carboidrati. In caso di attacco acuto di porfiria, dopo l'allontanamento di farmaci porfirinogenici, la terapia d'elezione consiste nella somministrazione endovenosa di arginato di ematina. Se l'attacco acuto è meno grave e si esclude iponatremia, può trovare indicazione la somministrazione in vena di soluzione glucosata.

A volte l'ematina viene somministrata anche tra un attacco e l'altro di malattia in modo simil profilattico, anche se attualmente il farmaco non è approvato per la profilassi e possiede alcune limitazioni.

Anche il trapianto di fegato rappresenta una possibile strategia di trattamento per questi pazienti.



GIVOSIRAN

Tra i trattamenti attualmente in studio per la terapia delle porfirie epatiche acute c'è givosiran, un farmaco che si basa sulla tecnologia dell'RNA interference (RNAi), che ha come target l'aminolevulinato sintasi 1 (ALAS1).

Bloccando la sintesi di ALAS1, givosiran diminuisce la produzione di acido aminolevulinico (ALA) e porfobilinogeno (PBG) responsabili dei sintomi della malattia.

Givosiran ha mostrato risultati promettenti in uno studio di fase I condotto in pazienti adulti con porfiria acuta intermittente, con attacchi ricorrenti della malattia.

Lo studio ha incluso 4 coorti di pazienti trattati con diverse dosi del farmaco per un periodo di 6 mesi. Alla fine del trattamento i pazienti sono entrati in una fase successiva dello studio fino a 48 settimane di terapia.

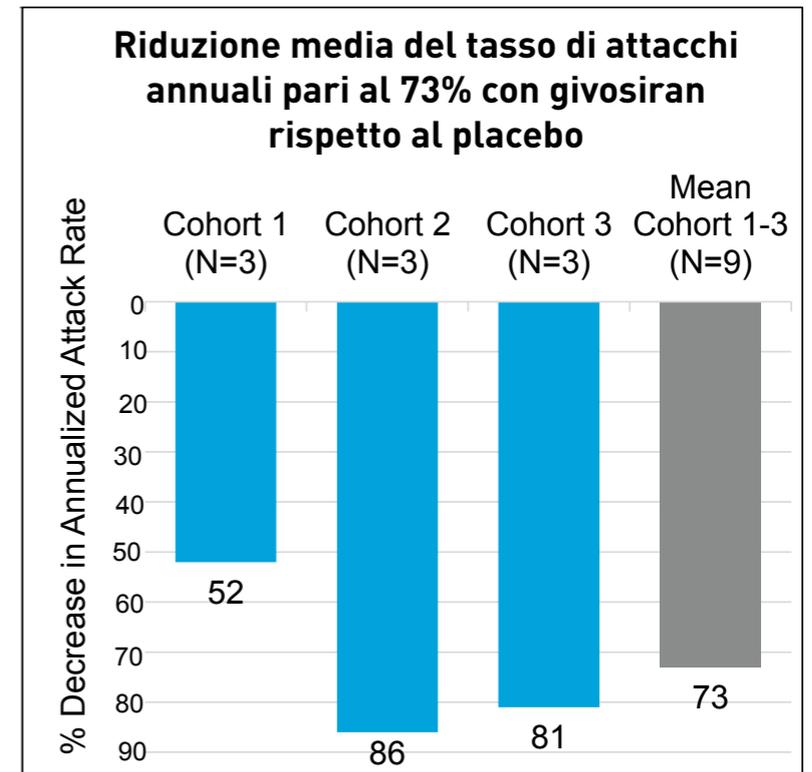
Nello studio, il farmaco ha dato una prova iniziale di attività clinica, riducendo la quantità di ALA e di PBG, con una riduzione media pari al 73% dell'incidenza di attacchi di malattia, rispetto al placebo.

Il farmaco è risultato essere generalmente ben tollerato, senza gravi eventi avversi correlati al trattamento.

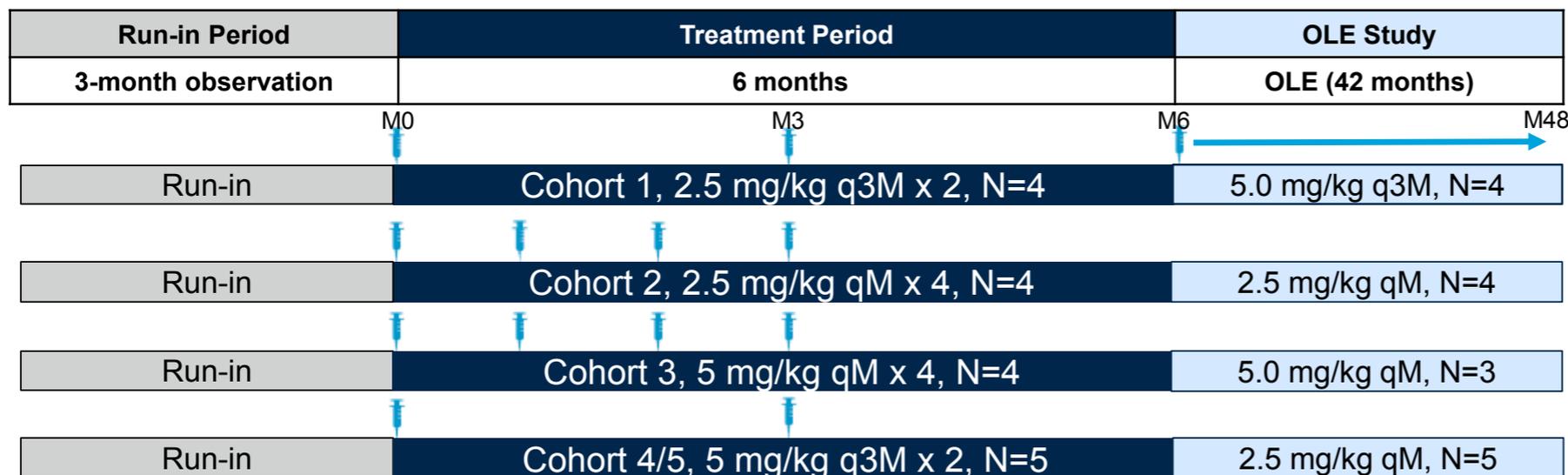
Nel mese di novembre del 2017 Alnylam ha avviato il trial di Fase III **Envision**, uno studio globale, multicentrico, randomizzato, in doppio cieco e controllato con placebo, che in più di 20 Paesi valuterà l'efficacia e la sicurezza di givosiran su circa **75 pazienti** con una diagnosi documentata di porfiria epatica acuta. I pazienti saranno randomizzati in rapporto 1:1 per ricevere 2,5 mg/kg di givosiran o placebo, somministrati mensilmente per

via sottocutanea, per un periodo di trattamento di 6 mesi. L'endpoint primario è il tasso annuo di attacchi di porfiria che richiedono l'ospedalizzazione, la visita urgente o la somministrazione di emina a domicilio.

L'azienda prevede di riportare i dati dell'analisi *ad interim* nella metà del 2018 e, ipotizzando risultati positivi e in attesa di una revisione del programma da parte dell'americana Food and Drug Administration (FDA) al momento dell'analisi intermedia, intende presentare negli Stati Uniti una domanda di registrazione di nuovo farmaco (NDA) per givosiran verso la fine del 2018.



Attacchi che richiedono ospedalizzazione, visite e cure urgenti o emina



A givosiran è stata concessa la denominazione di Farmaco Orfano, sia nell'Unione Europea che negli Stati Uniti, per il trattamento delle porfirie acute epatiche. In precedenza, il farmaco aveva già ricevuto la designazione di Breakthrough Therapy da parte della FDA e quella di PRIME da parte dell'EMA.



EMOFILIA



DNA E RNA

COME AGIRE
SUL DNA

COME AGIRE
SULL'RNA

AMILOIDOSI

PORFIRIA

EMOFILIA

FH

SMA

Emofilia

Che cos'è e come si manifesta

L'emofilia è una malattia ereditaria dovuta a un difetto della coagulazione del sangue. La malattia dipende dall'assenza o carenza di uno dei fattori coinvolti nella coagulazione. Se ne distinguono due forme: la A, in cui manca il fattore VIII, e la B, in cui manca il fattore IX; delle due è la A quella più frequente (80% dei casi).

I sintomi sono praticamente identici nei due casi e consistono in emorragie più o meno gravi a seguito di traumi, ferite, operazioni chirurgiche, oppure emorragie interne apparentemente spontanee. La gravità dei segni clinici dipende dall'entità del deficit del fattore della coagulazione.

Ai fini della terapia, è molto importante distinguere tra le due forme, tramite esami di laboratorio oppure conoscendo la storia

DIFFUSIONE, TIPOLOGIE E GRAVITÀ DELL'EMOFILIA

1 persona su 10mila è affetta da emofilia, pari a circa 400mila persone nel mondo, quasi esclusivamente di sesso maschile

80-85% **EMOFILIA A**, difetto del fattore VIII

15-20% **EMOFILIA B**, difetto nel gene del fattore IX

<1% **CARENZA DEL FATTORE VII SU BASE AUTOIMMUNITARIA**, forma sporadica rara, insorge in età adulta per carenza del fattore VII



QUALI SONO LE COMPLICANZE PIÙ FREQUENTI DELL'EMOFILIA?

Le **emorragie** a carico delle articolazioni (emartri) e dei muscoli (ematomi) rappresentano le emorragie più frequenti nel paziente emofilico.

Gli **emartri** rappresentano il 75% dei fenomeni emorragici nelle forme di emofilia grave e moderata e si manifestano soprattutto a livello di ginocchia, gomiti e caviglie, compromettendone la funzionalità.

Gli **ematomi muscolari** possono dare luogo a raccolte di sangue molto abbondanti che, con il tempo, danneggiano il muscolo, fino a ridurne la massa e le capacità di movimento.

familiare del paziente. Secondo la National Hemophilia Foundation, nel mondo sono 400mila le persone affette da emofilia, mentre secondo il Registro nazionale delle coagulopatie congenite dell'Istituto superiore di sanità, sono quasi 5mila le persone affette da emofilia in Italia, di cui oltre 2mila in forma grave. La gravità della malattia dipende dalla quantità di fattore della coagulazione che l'organismo riesce a produrre: lieve (attività del fattore mancante 5-40%), moderata (1-5%), grave (< 1%).

Come si trasmette

L'emofilia dipende da alterazioni dei geni codificanti per i fattori VIII o IX della coagulazione, entrambi localizzati sul cromosoma X. Per questo, la malattia si trasmette con modalità recessiva legata all'X: in genere solo i maschi (che hanno un solo cromosoma X) presentano i sintomi, mentre le femmine portatrici sono solitamente asintomatiche o possono in alcuni casi presentare forme più leggere della malattia (perché possiedono un altro cromosoma X oltre a quello mutato). In circa un terzo dei casi di emofilia A, invece, il difetto non viene ereditato ma si verifica al momento della formazione dei gameti (mutazione *de novo*).



Diagnosi

Il sospetto di malattia viene avanzato in base alle manifestazioni cliniche, mentre la diagnosi si basa sui test della coagulazione, che rivelano un allungamento dei tempi della coagulazione del sangue. Il tipo e la gravità dell'emofilia sono definiti dai dosaggi specifici dei livelli dei fattori VIII e IX. Se in una famiglia si conoscono le mutazioni responsabili della patologia, è possibile effettuare la diagnosi prenatale attraverso prelievo dei villi coriali.

Terapia

Emorragie e sanguinamenti. L'obiettivo della terapia non è soltanto quello di ridurre il rischio di emorragia grave, ma piuttosto prevenire sanguinamenti cronici che possano produrre l'artropatia emofiliaca (cioè la degenerazione delle articolazioni causata dalla raccolta di sangue). Il trattamento consiste nell'infusione, per via endovenosa, del fattore della coagulazione carente e prende il nome di terapia sostitutiva.

Cure "on demand" o come profilassi. La cura può essere somministrata «on-demand», ovvero al bisogno, in caso di emorragia, oppure come prevenzione (profilassi) di eventi emorragici. La profilassi resta l'approccio di prima scelta, specialmente per i bambini affetti da emofilia grave. È

Fitusiran

Fitusiran è una terapia sperimentale che adotta un approccio completamente nuovo per sopperire alla carenza dei fattori VIII e IX nei pazienti con emofilia A e B.

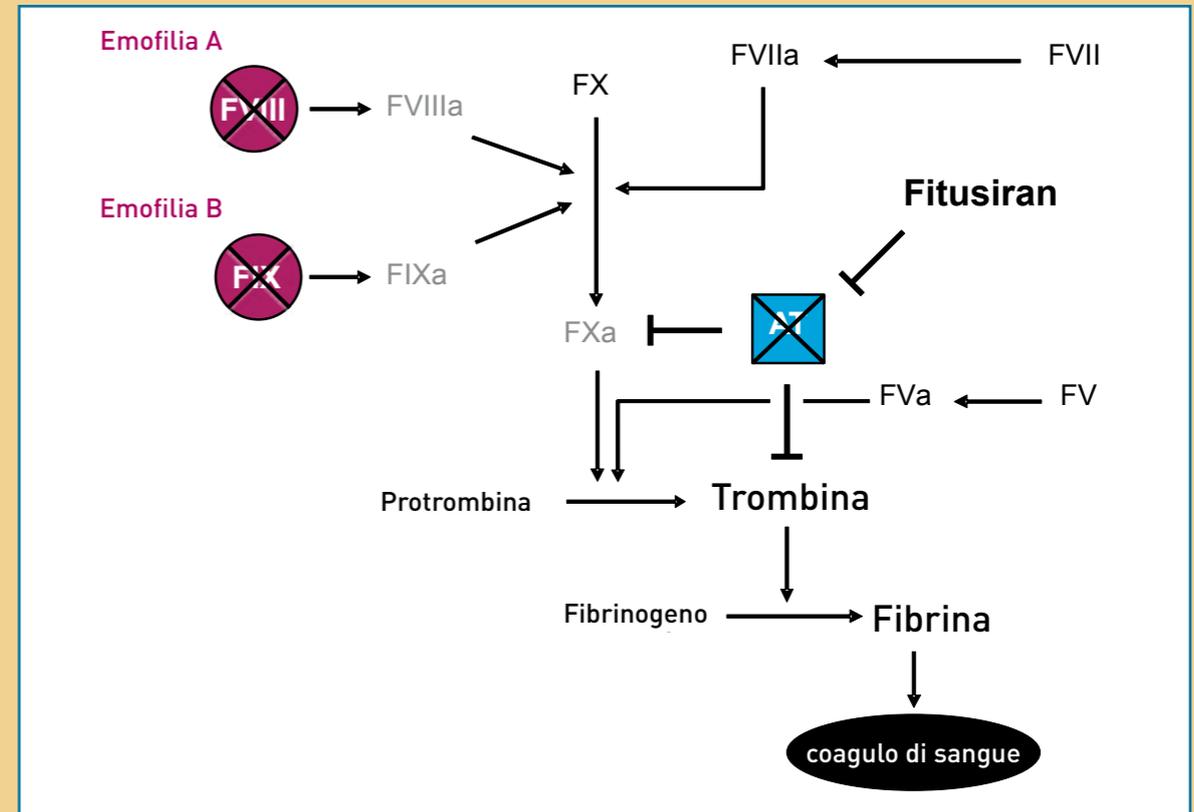
Il farmaco sfrutta infatti la RNA interference e ha come target gli RNA messaggeri codificanti per la antitrombina III, al fine di ridurre la sintesi di quest'ultima. Obiettivo di questa terapia è di promuovere la generazione di trombina sufficiente per ripristinare l'emostasi e prevenire l'emorragia.

La molecola permette quindi di bypassare la carenza dei fattori della coagulazione facendo in modo che si generi quantità sufficiente di trombina tale da produrre il fibrinogeno necessario per la coagulazione.

Il farmaco viene somministrato una volta al mese per via sottocutanea, un elemento che ne aumenta l'interesse terapeutico.

L'altro elemento di interesse è che, agendo a valle dei fattori VIII e IX, il farmaco potrebbe essere utilizzato per l'emofilia A e B e sarebbe quindi un antiemofilia universale.

Attualmente fitusiran ha completato la fase II del suo sviluppo clinico e si stanno arruolando pazienti per il programma di fase III chiamato ATLAS in pazienti con emofilia A e B, con o senza inibitori.



Lo studio di fase I su fitusiran è stato pubblicato sul New England Journal of Medicine ad agosto 2017.



efficace, sicura e permette una qualità di vita analoga a quella delle persone non affette da questa condizione. Il limite principale della terapia sostitutiva consiste nella scomodità della via di somministrazione endovenosa e nella durata del fattore sostitutivo in circolo, che costringe i pazienti a frequenti somministrazioni infrasettimanali. Questa soluzione non cura l'emofilia, ne riduce solo il potenziale emorragico. Inoltre, la somministrazione di fattore VIII o IX esogeno può determinare lo sviluppo di anticorpi (inibitori) nel ricevente, annullando o riducendo il potere curativo del farmaco.

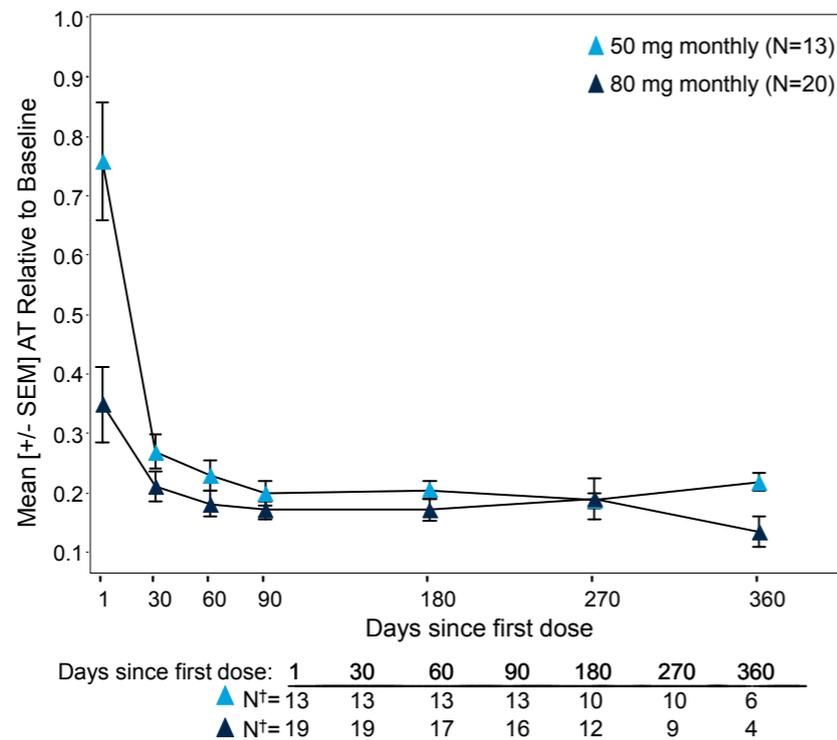
Nuovi farmaci. Per la terapia dell'emofilia, da tempo sono disponibili i fattori VIII e IX estrattivi e più di recente sono stati introdotti quelli di origine biotecnologica. Questi ultimi sono oggetto di evoluzione grazie a modificazioni della loro struttura che ne aumentano l'emivita, riducendo il numero di iniezioni necessarie per la terapia.

Tra i nuovi farmaci, oggi sono disponibili fattori della coagulazione sostitutivi a lunga durata d'azione, una terapia sostitutiva del fattore VIII di derivazione porcina, che di conseguenza non viene facilmente riconosciuta dagli anticorpi, chiamata susocog alfa ed emicizumab.

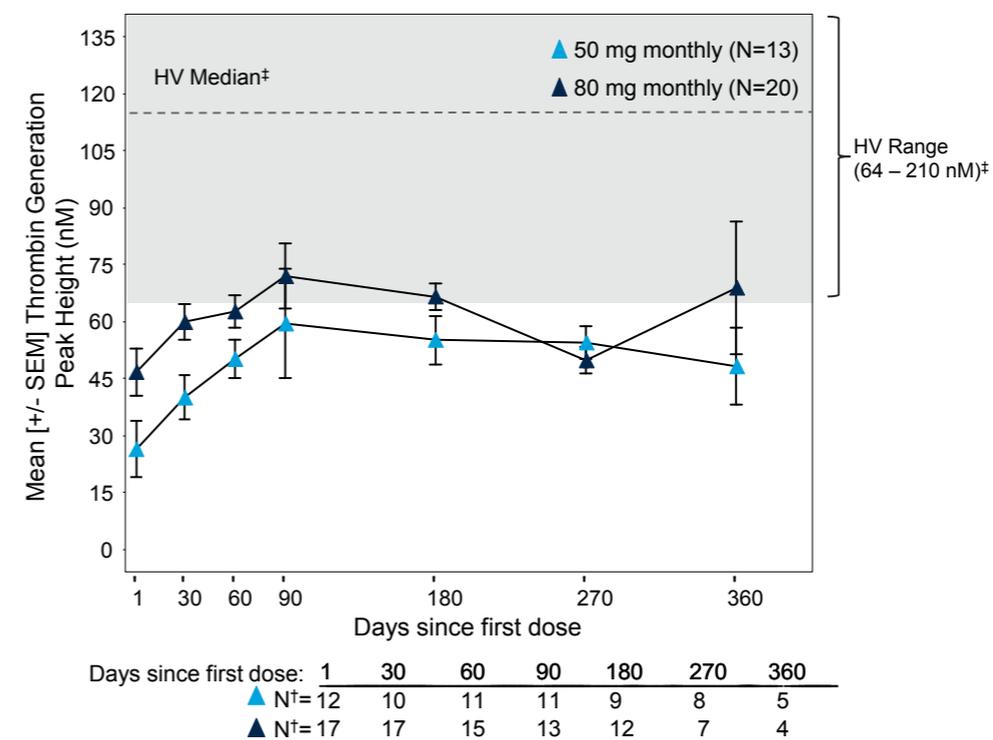
Emicizumab è una nuova molecola somministrata settimanalmente per via sottocutanea che corregge il difetto coagulativo in maniera alternativa al fattore VIII, usando un anticorpo monoclonale bispecifico che mima l'azione del fattore VIII perché si lega contemporaneamente al fattore X e al IXa e determina la formazione del fattore X attivato, esattamente come fa il fattore VIII fisiologico o quello somministrato come farmaco. Per ora emicizumab è approvato solo per i pazienti che presentano gli inibitori, ovvero anticorpi diretti contro il fattore VIII esogeno ma lo si sta studiando anche per i pazienti senza inibitori come alternativa ai fattori VIII sintetici o estrattivi.



Livelli di antitrombina



Generazione di trombina



Terapie in studio. Attualmente sono in studio due terapie geniche per l'emofilia A e B. Le terapie consistono nell'inserire nel DNA delle cellule epatiche il gene del fattore VIII e IX attraverso un vettore virale modificato. I primi risultati sembrano promettenti e di fatto queste rappresenterebbero la prima vera cura definitiva dell'emofilia. Un altro farmaco sperimentale in sviluppo per la terapia dell'emofilia A e B è fitusiran.

I dati più recenti su fitusiran: la fase I e II

I risultati clinici della fase di estensione dello studio di fase I e II su fitusiran sono stati presentati in luglio 2017 in occasione del 26° Convegno dell'International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) tenutosi a Berlino.

Lo studio di fase II in aperto ha incluso 33 pazienti con emofilia A (N = 27) e emofilia B (N = 6). Di questi soggetti, 14 presentavano inibitori, tra cui uno con emofilia B. Fitusiran è stato somministrato alla dose di 50 mg (N = 13) o 80 mg (N = 20) in una inie-

zione mensile, sottocutanea, con basso volume (meno di 1 mL). I pazienti sono stati trattati fino a 20 mesi, con una mediana di 11 mesi di studio.

Per quanto riguarda i risultati clinici, il trattamento con fitusiran ha determinato una riduzione dell'80% circa dei livelli di antitrombina, con corrispondenti aumenti della generazione di trombina. In un'analisi esplorativa post-hoc degli eventi emorragici, è stato raggiunto un ABR (tasso annuale di sanguinamenti) mediano di 1 (range interquartile [IQR]: 0-3) per tutti i pazienti (N = 33) e un ABR medio pari a zero (IQR: 0-3) è stato raggiunto per il sottogruppo di pazienti con inibitori (N = 14). Inoltre, una percentuale elevata di pazienti (16/33, 48%) non ha avuto sanguinamenti nel periodo di osservazione e la maggior parte dei pazienti (22/33, 67%) ha sperimentato zero sanguinamenti spontanei. Tutti gli eventi di sanguinamento sono stati gestiti con un fattore di sostituzione (fattore VIII o IX ricombinanti) o con agenti bypassanti.

Lo studio di fase I e la fase II di estensione hanno confermato il

generale buon profilo di sicurezza e tollerabilità di fitusiran. Lo scorso settembre era stata annunciata la decisione di sospendere la somministrazione del farmaco in tutti gli studi in corso dopo che un paziente con emofilia A era deceduto per via di un evento trombotico fatale durante l'estensione in aperto dello studio di fase II. A dicembre la FDA ha dato la sua approvazione alla ripresa degli studi clinici in corso dopo aver discusso con le aziende che stanno sviluppando il farmaco sulle misure di sicurezza e su una strategia di limitazione del rischio, comprese delle linee guida specifiche inserite nel protocollo e ulteriori informazioni per ricercatori e pazienti in merito a dosi ridotte di fattore sostitutivo o di agente bypassante per trattare eventuali sanguinamenti significativi.

I tre trial del programma clinico ATLAS di Fase III

ATLAS-INH, uno studio in aperto, randomizzato, con controllo attivo, della durata di 9 mesi, che arruola pazienti con emofilia A o B con inibitori, che ricevono la terapia al bisogno. L'endpoint primario è il tasso di sanguinamenti su base annua (ABR) e gli endpoint secondari comprendono il tasso annuo di sanguinamenti spontanei, il tasso annuo di sanguinamenti delle articolazioni e la qualità di vita misurata dal punteggio nel questionario Haem-A-QOL.

ATLAS-A/B, uno studio in aperto, randomizzato, con controllo attivo, della durata di nove mesi, che arruola pazienti con emofilia A o B senza inibitori, che ricevono la terapia al bisogno. L'endpoint primario è l'ABR, e gli endpoint secondari includono il tasso annuo di sanguinamenti spontanei, il tasso annuo di sanguinamenti delle articolazioni e la qualità di vita misurata dal punteggio nel questionario Haem-A-QOL.



GUARDA IL VIDEO

ATLAS-PPX, uno studio di crossover unidirezionale, in aperto, che ha in programma di arruolare pazienti con emofilia A o B, con inibitori, che ricevono la terapia di profilassi come precedente standard di cura. In questo studio i pazienti riceveranno la terapia di profilassi standard per sei mesi e poi passeranno al trattamento con fitusiran per sette mesi. L'ABR sarà misurato in modo prospettico in entrambi i periodi. L'endpoint primario è l'ABR nel periodo con fitusiran e nel periodo di profilassi con fattori di sostituzione o agenti bypassanti. Gli endpoint secondari includono il tasso annuo di sanguinamenti spontanei, il tasso annuo di sanguinamenti delle articolazioni e la qualità di vita misurata dal punteggio nel questionario Haem-A-QOL.



FH

IPERCOLESTEROLEMIA

FAMILIARE



Ipercolesterolemia familiare

L'ipercolesterolemia familiare è una malattia ereditaria in cui un'alterazione genetica provoca l'aumento del colesterolo nel sangue.

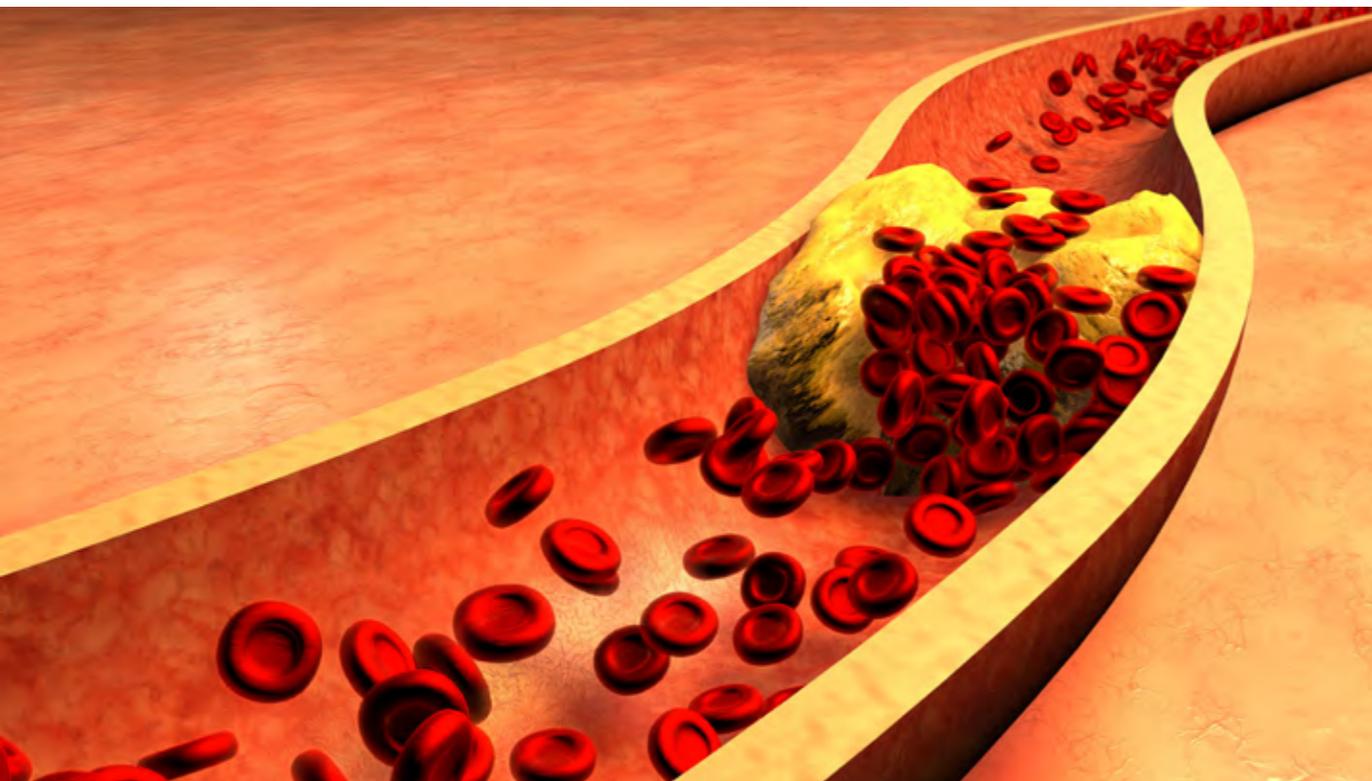
Nei pazienti con ipercolesterolemia familiare l'alterazione che si riscontra più frequentemente è a carico del gene che codifica per il recettore delle LDL, il cosiddetto colesterolo "cattivo". Questo recettore si trova sulla superficie della cellula e ha il compito di "catturare" le particelle di colesterolo LDL, rimuovendole dal sangue. L'alterazione del gene provoca la formazione di recettori per le LDL malfunzionanti, ossia di recettori che non sono in grado di rimuovere il colesterolo LDL dal sangue.

La maggior parte dei soggetti con ipercolesterolemia familiare ha ereditato un gene difettoso per il recettore delle LDL da uno dei genitori e un gene normale dall'altro genitore. Conseguentemente, in questi soggetti, circa la metà dei recettori per le

QUANTO È FREQUENTE L'IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE?

La forma eterozigote è presente in 1 soggetto su 200-250 della popolazione generale, il che significa potenzialmente 4,5 milioni di individui in Europa e probabilmente 35 milioni nel mondo.

La forma omozigote è più rara ed è presente in circa 1 soggetto su 160-300mila della popolazione generale.



LDL presenti sulla superficie delle cellule è correttamente funzionante. In questi casi si parla di **ipercolesterolemia familiare eterozigote**, mentre quando un soggetto eredita il gene difettoso per il recettore delle LDL da entrambi i genitori, si parla di **ipercolesterolemia familiare omozigote**. Quest'ultime sono forme di ipercolesterolemia molto rare e molto più gravi delle forme eterozigoti.

I soggetti con ipercolesterolemia familiare nella forma eterozigote presentano livelli di colesterolo LDL tra 200 e 500 mg/dl, mentre i soggetti con la forma omozigote della malattia hanno valori di colesterolo LDL superiori a 500 mg/dl.

L'ipercolesterolemia familiare è uno dei principali fattori di rischio cardiovascolare

La presenza di elevati valori di colesterolo LDL contribuisce all'instaurarsi di un processo di alterazione delle pareti dei vasi, noto come aterosclerosi, che a sua volta è strettamente correlato all'insorgenza di gravi complicanze cardio e cerebro vascolari.

L'aterosclerosi si manifesta inizialmente con la formazione di depositi di colesterolo all'interno della parete dei vasi sanguigni. Questo processo causa infiammazione, proliferazione cellulare, ulteriori depositi di colesterolo, formazione di tessuto cicatriziale e indurimento della parete vascolare. Tutto ciò ha come risultato finale la formazione delle cosiddette 'placche'.

Tali placche possono diminuire il flusso ematico fino a interromperlo, privando organi importanti come il cuore e il cervello di un adeguato apporto di ossigeno e nutrienti. Concreto è anche il rischio che il vaso sanguigno colpito vada incontro a rottura o che la placca aterosclerotica si rompa e subisca un processo coagulativo, con formazione di un trombo spesso causa di infarto cardiaco improvviso o ictus.

Nei soggetti con ipercolesterolemia familiare, il rischio di malattia cardiovascolare è sensibilmente più elevato rispetto alla popolazione generale. Tale rischio aumenta con l'aumentare dei livelli di colesterolo LDL ed è amplificato dalla presenza di ulteriori fattori di rischio, quali ad esempio diabete e ipertensione.



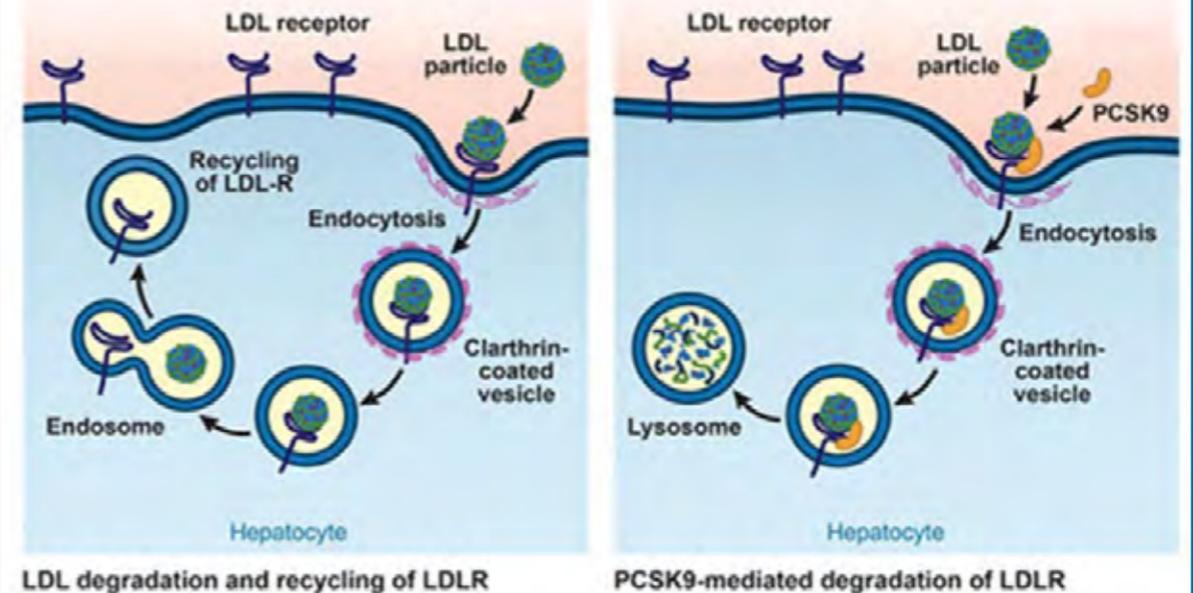
Terapia

Le mutazioni nel gene *LDL* che codifica per il recettore delle LDL sono responsabile di circa il 90% delle forme geneticamente determinate di ipercolesterolemia familiare. La restante parte dei casi è dovuta a mutazioni che alterano il sito di legame dell'apoB al recettore delle LDL o ad altre alterazioni genetiche che aumentano l'attività della proteina PCSK9, causando una riduzione dell'espressione o dell'attività del recettore delle LDL.

Le attuali linee guida sottolineano l'importanza delle **diagnosi precoce** perché il trattamento della malattia è tanto più efficace quanto prima viene iniziato. L'obiettivo della terapia, secondo le attuali raccomandazioni, è quello di ridurre i livelli di LDL colesterolo fino a valori <100 mg/dl nei soggetti adulti, <70 mg/dl negli adulti con malattia coronarica o diabete e <135 mg/dl nei bambini. Per raggiungere questi obiettivi sono disponibili diversi farmaci; le **statine** sono la terapia di prima scelta. Questi farmaci riducono il rischio di malattia coronarica nei pazienti con ipercolesterolemia familiare, ma l'aumento del dosaggio non risulta in una ulteriore riduzione dei livelli di LDL a causa di un effetto plateau, il quale supporta la necessità di utilizzare altri farmaci in combinazione per raggiungere i livelli target di colesterolo. Questi farmaci includono **ezetimibe**, **mipomersen** e **lomitapide** o gli **inibitori di PCSK9**.

Mipomersen e lomitapide sono registrati per i pazienti con ipercolesterolemia familiare omozigote, mentre i pazienti con la forma eterozigote della malattia possono beneficiare del trattamento combinato statine/ezetimibe, che porta a una riduzione ulteriore dei livelli di colesterolo LDL pari al 15-18%, e più recentemente dagli anticorpi monoclonali diretti contro PCSK9.

PCSK9: meccanismo d'azione



Lambert G, et al. *J. Lipid Res.* 2012;53:2515-2524.^[6]

Inibitori di PCSK9

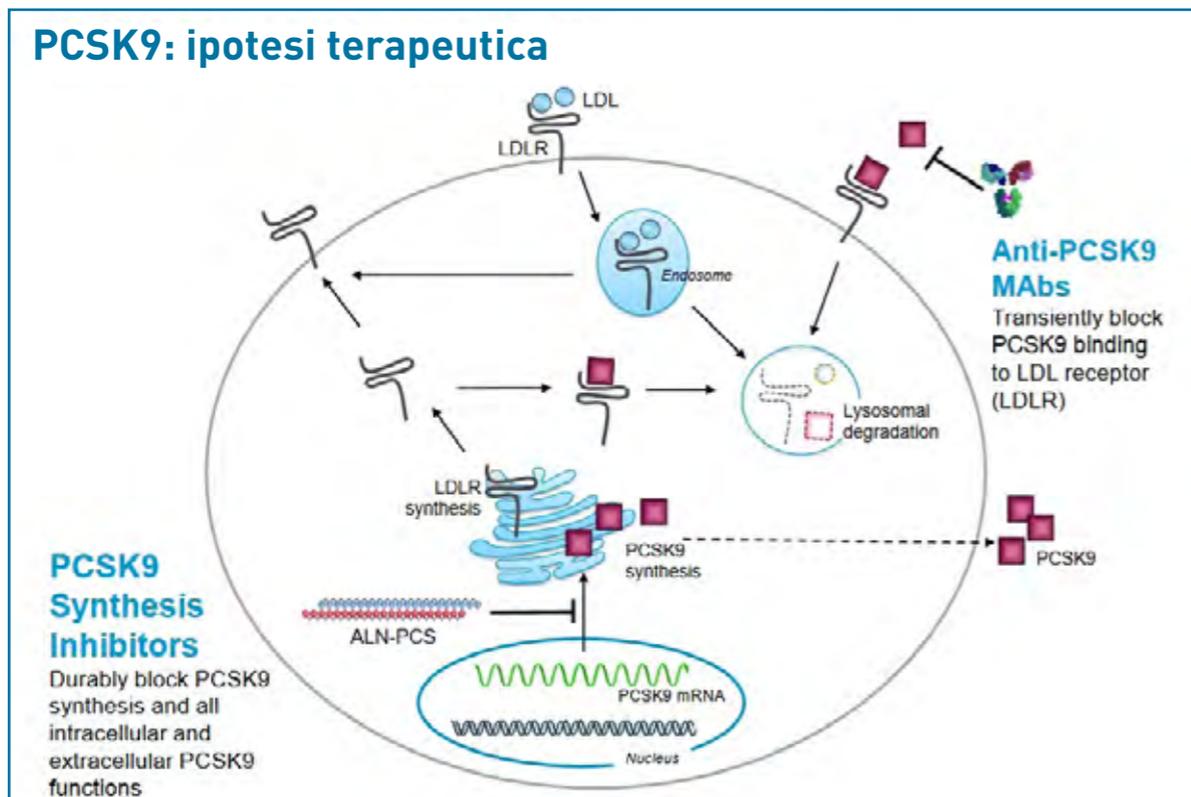
Tra le novità più recenti nel trattamento dell'ipercolesterolemia ci sono gli anti PCSK9 (proteina convertasi della subtilisina/kexina di tipo 9). Quest'ultima è una proteina che nell'organismo degrada i recettori per le lipoproteine LDL che si trovano sulla superficie delle cellule epatiche. Il recettore per le LDL, è molto importante nell'economia del metabolismo del colesterolo perché serve per regolare la quantità di colesterolo LDL nel sangue.

Quando questo recettore non funziona per effetto di una malattia, oppure quando non funziona perché PCSK9 ne favorisce la distruzione, allora il colesterolo LDL aumenta. Bloccando PCSK9 si mantiene attivo il recettore per le LDL e in questo modo si contribuisce a ridurre il colesterolo LDL circolante nel sangue.

Alirocumab e evolocumab sono i due anticorpi monoclonali anti PCSK9 attualmente approvati per il trattamento dell'ipercolesterolemia familiare.

Alirocumab è un medicinale indicato nel trattamento di pazienti adulti con ipercolesterolemia primaria, generalmente dovuta a un'anomalia genetica. L'ipercolesterolemia primaria include l'ipercolesterolemia familiare eterozigote e l'ipercolesterolemia non familiare (quando l'anomalia genetica compare spontaneamente senza precedenti in famiglia). Il farmaco è anche usato per trattare la dislipidemia mista (livelli anormali di grassi nel sangue, inclusi livelli elevati di colesterolo LDL).

Evolocumab è un medicinale indicato nel trattamento di pazienti adulti con ipercolesterolemia primaria e dislipidemia mista e di adulti e bambini di età pari o superiore a 12 anni affetti da ipercolesterolemia familiare omozigote, una forma grave di ipercolesterolemia causata da un'anomalia genetica ereditata da entrambi i genitori.



Inclisiran, nuovo anti PCSK9 su base genetica

Inclisiran è un oligonucleotide sintetico a doppio filamento (PCSK9si), che viene assorbito selettivamente a livello epatico e attiva un complesso di silenziamento in grado di degradare l'RNA messaggero responsabile della sintesi di PCSK9.

Il farmaco si è dimostrato in grado di ridurre i livelli di colesterolo LDL per almeno un anno nei pazienti ad alto rischio cardiovascolare e con valori elevati di colesterolo LDL, secondo i risultati dello studio di Fase II ORION-1.

Il principale vantaggio di inclisiran è quello di una somministrazione più comoda rispetto agli altri anti PCSK9. Il farmaco si somministra infatti per via sottocutanea attraverso due iniezioni l'anno.

Gli ultimi arrivati fra gli ipolipemizzanti, gli anticorpi monoclonali anti-PCSK9 si sono dimostrati molto efficaci nel ridurre il coleste-

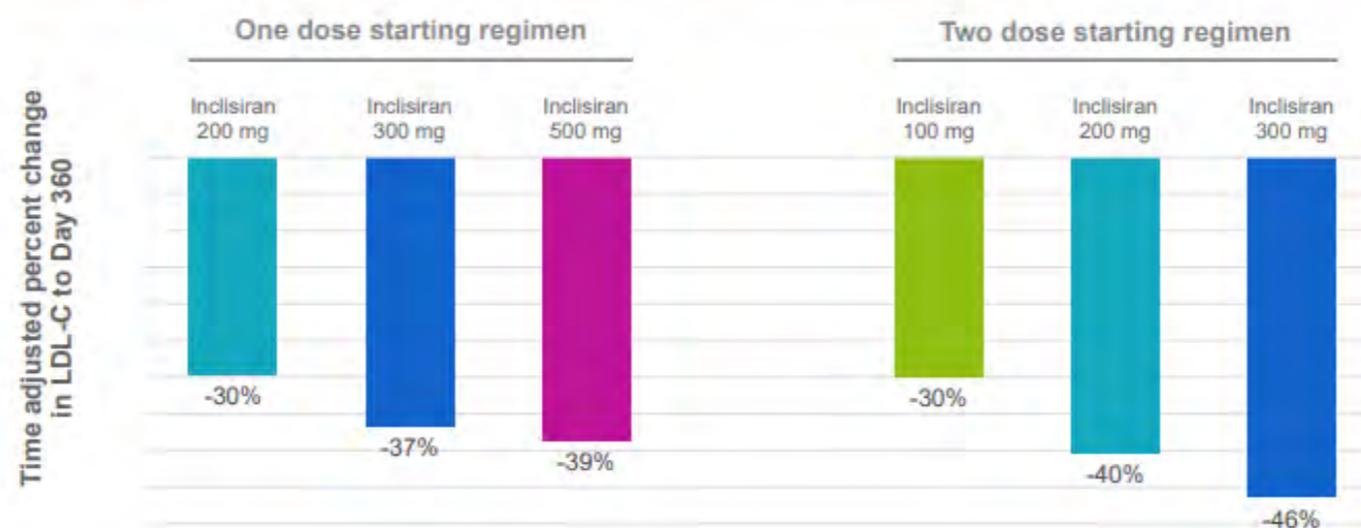
rolo LDL e la malattia aterosclerotica cardiovascolare. Tuttavia, il trattamento con questi farmaci richiede da 12 a 26 iniezioni all'anno.

Lo studio ORION-1

L'obiettivo dello studio ORION 1, un trial randomizzato, in doppio cieco e controllato con placebo, era quello di identificare il dosaggio e la frequenza di somministrazione necessari per gli studi di fase III; in particolare si è valutato l'impatto di una o due iniezioni sottocutanee di inclisiran sulla riduzione del colesterolo LDL dopo un anno.

Lo studio ha coinvolto 501 pazienti con malattia aterosclerotica cardiovascolare e livelli elevati di colesterolo LDL (> 70 mg/ml), nonostante una terapia con statine alla dose massima tollerata, e pazienti senza malattia aterosclerotica cardiovascolare ma con fattori di rischio cardiovascolare elevato come il diabete e l'ipercolesterolemia familiare con colesterolo LDL > 100mg/dl

Riduzione media di LDL-C dal giorno 1 al giorno 360



nonostante la terapia con statine alla dose massima tollerata. I pazienti sono stati randomizzati in otto gruppi di trattamento: 200, 300 o 500 mg di inclisiran o un placebo somministrati con una singola iniezione il giorno 1 oppure 100, 200 o 300 mg di inclisiran o un placebo somministrati con due iniezioni, una il giorno 1 e una il giorno 90.

L'endpoint primario dello studio era la variazione del colesterolo LDL a 6 mesi per ogni dose di inclisiran rispetto al placebo. Come già riportato in precedenza, il dosaggio pari a due iniezioni da 300 mg è quello con cui si ottiene la maggiore riduzione del colesterolo LDL a 6 mesi.

Le analisi dimostrano che l'effetto di riduzione del colesterolo LDL ottenuto con inclisiran si mantiene nel tempo. La riduzione media del colesterolo LDL a un anno con una singola iniezione da 200, 300 o 500 mg di inclisiran è risultata rispettivamente del 31,6%, 38,1% e 39,8%, mentre quella associata a due iniezioni da 100, 200 o 300 mg è stata rispettivamente del 31%, 41,1% e 46,8%.

Come previsto sulla base di modelli predittivi, i pazienti hanno cominciato a tornare ai valori di colesterolo LDL basali a un tasso medio del 2-3% al mese, il che significa che torneranno di nuovo ai livelli di partenza entro circa 18-21 mesi nei due gruppi.



Ogni paziente trattato con le due iniezioni ha avuto una risposta significativa e le riduzioni del colesterolo LDL nel tempo sono state praticamente costanti.

Il profilo complessivo degli eventi avversi e la loro incidenza sono risultati simili con inclisiran e il placebo, a parte un lieve eccesso numerico di reazioni nel sito di iniezione con il farmaco in studio.

Non si sono osservati aumenti delle transaminasi epatiche correlati al farmaco in studio e gli aumenti transitori delle transaminasi hanno avuto un'incidenza simile nei due gruppi. Inoltre, non si sono evidenziate differenze significative tra i due gruppi nell'incidenza delle mialgie o degli aumenti della CPK e non si sono registrati decessi correlati al farmaco in studio. In precedenza erano stati registrati due decessi, dopo 100 giorni dalla prima iniezione, correlati alla malattia di base.





minor groove

Deoxyribonu

- is a molecule
used in the
of all known

GUANINE

major groove

CYTOSINE

THYMIN

SMA

ATROFIA MUSCOLARE SPINALE

Atrofia muscolare spinale (SMA)

L'atrofia muscolare spinale (SMA) è una malattia genetica caratterizzata dalla perdita dei motoneuroni del midollo spinale e del tronco encefalico, comportando debolezza e atrofia muscolare severa e progressiva.

La malattia si trasmette per via ereditaria autosomica recessiva, quindi entrambi i genitori devono presentare il difetto genetico (portatori sani) affinché i figli possano ereditare la malattia. Nel caso in cui entrambi i genitori siano portatori, la probabilità che il gene venga trasmesso da entrambi al nascituro rendendolo affetto da SMA è del 25%, cioè un caso su quattro.

A causa della perdita o del difetto del gene **SMN1** (Survival Motor Neuron 1), le persone affette da SMA non producono sufficienti

quantità di proteina **SMN**, fondamentale per la sopravvivenza dei motoneuroni. La gravità della SMA è correlata con la quantità della proteina SMN. I soggetti affetti da SMA a esordio infantile, la forma più grave, producono una quantità molto bassa di proteina SMN e non raggiungono la capacità di stare seduti senza ausili o di vivere oltre i due anni senza supporto respiratorio. Questi bambini possono andare incontro a paralisi e avere difficoltà nel mantenimento di funzioni vitali, come respirare e deglutire.

I muscoli involontari, come ad esempio quelli che controllano le funzioni della vescica e dell'intestino, non sono colpiti dalla malattia. Anche l'udito e la vista non sono impattati e l'intelligenza è normale. I ricercatori hanno notato un quoziente intellettivo molto elevato nei bambini affetti da SMA.



Gli individui affetti da SMA a insorgenza tardiva producono una quantità maggiore di proteina SMN e hanno forme di SMA meno severe ma sempre in grado di modificare aspettativa e qualità di vita. Possono andare incontro a significativa debolezza muscolare e disabilità quali l'incapacità di stare in piedi o di camminare in modo autonomo.

Le forme della SMA

- **La SMA di Tipo 1:** è la forma più grave della malattia, con esordio entro i primi 6 mesi di vita. I bambini affetti da SMA 1 non sono in grado in molti casi di acquisire il controllo del capo e di mantenere la posizione seduta senza sostegno. Spesso la malattia porta alla morte nei primi anni di vita a causa di insufficienza respiratoria o infezioni polmonari.
- **La SMA di Tipo 2:** è la forma intermedia della malattia, con esordio tra i 7 e i 18 mesi di vita. I bambini affetti da SMA 2 stanno seduti, ma nella maggior parte dei casi non acquisiscono la capacità di camminare autonomamente. L'aspettativa di vita varia in base alla gravità delle problematiche a livello respiratorio e va oltre l'età adulta.
- **La SMA di Tipo 3:** è la forma meno grave di malattia, che compare dopo i 18 mesi di vita e può manifestarsi anche durante l'infanzia e l'adolescenza tra i 5 e i 15 anni. Le problematiche a livello respiratorio, di masticazione e di deglutizione sono di più lieve entità rispetto alle forme SMA 1 e SMA 2.
- **La SMA di Tipo 4:** si manifesta nell'età adulta e ha un decorso per lo più lento.

COME SI FA LA DIAGNOSI DI SMA?

La diagnosi viene effettuata a partire da un'attenta valutazione clinica, che tenga in considerazione anche la storia medica familiare del paziente.

In genere se il sospetto clinico è quello di SMA si procede direttamente all'esecuzione del test genetico specifico che permette di identificare con precisione il difetto genico, e quindi porre diagnosi, nei pazienti affetti dalla malattia e nei portatori sani.

Nei casi dubbi dal punto di vista clinico o se il test genetico risulta negativo sono disponibili anche esami strumentali, come la biopsia muscolare e l'elettromiogramma (EMG), che permette di valutare il livello di contrazione muscolare.

Terapia: nusinersen

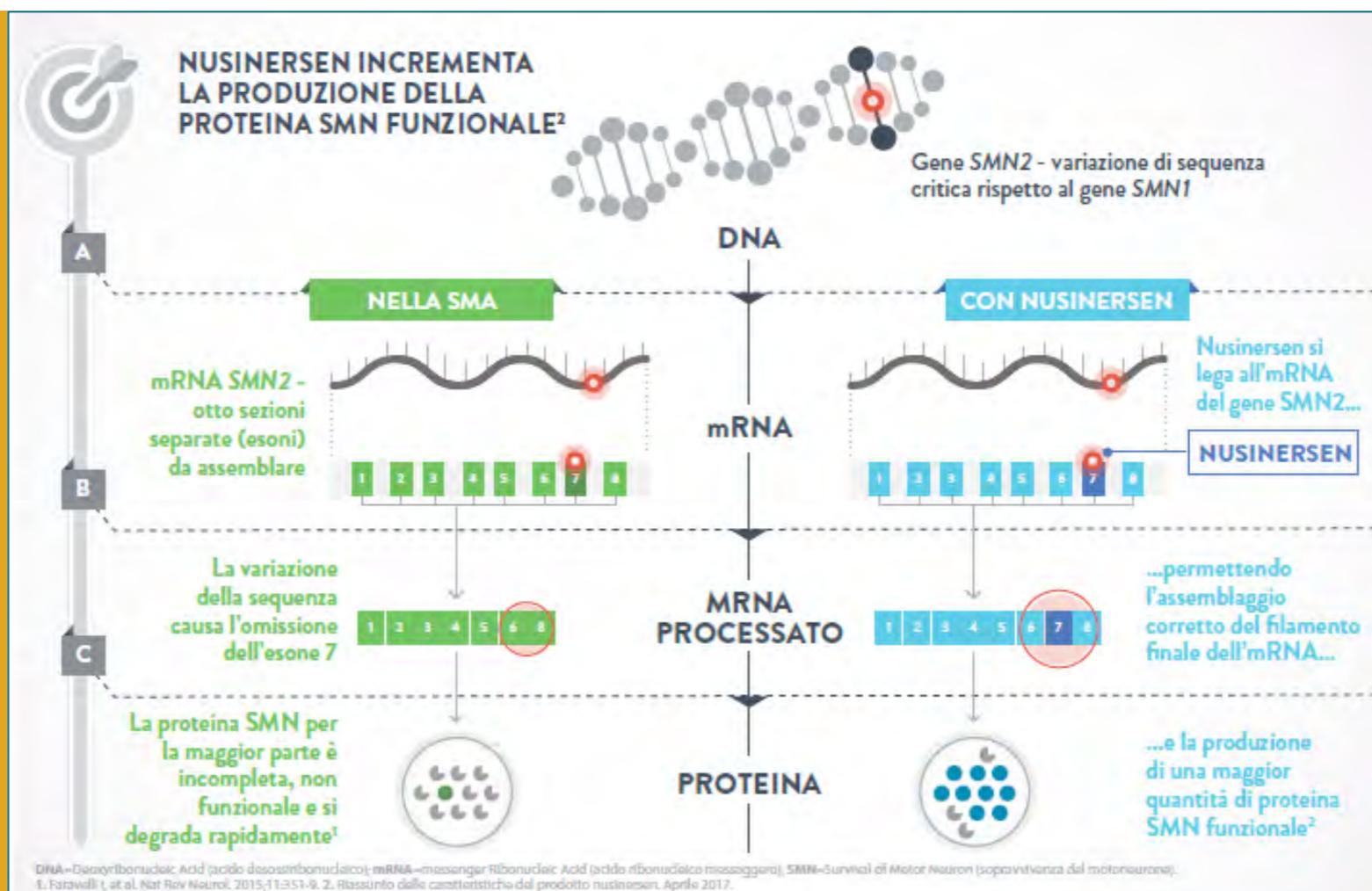
Informazioni sullo studio ENDEAR

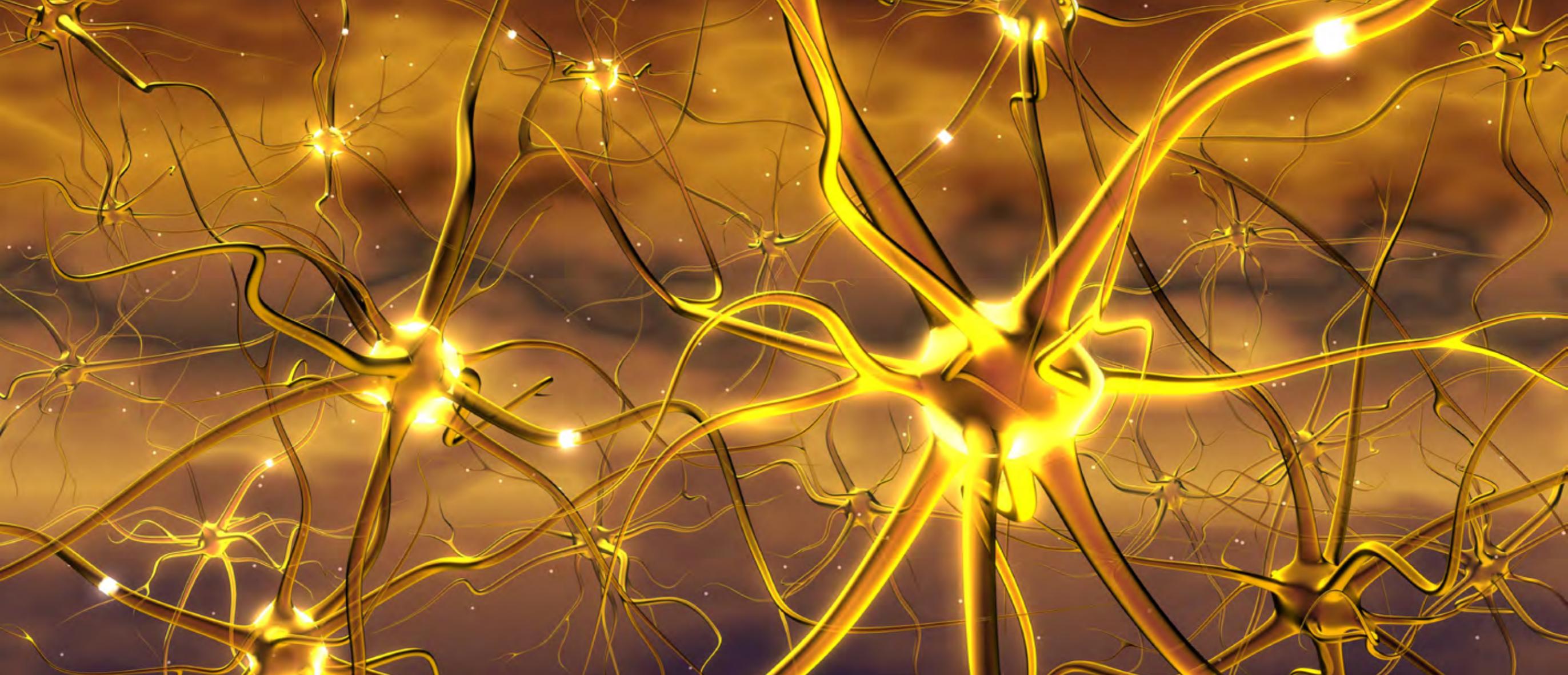
Nusinersen è il primo e unico farmaco approvato per il trattamento dell'atrofia muscolare spinale. È un oligonucleotide antisenso (ASO) studiato per trattare la SMA causata da mutazioni o delezioni del gene SMN1 situato sul cromosoma 5q, che comporta deficit della proteina SMN. Il farmaco altera lo splicing del pre-mRNA di SMN2 al fine di aumentare la produzione della proteina SMN di lunghezza completa.

Il farmaco si somministra per via intratecale, tramite una puntura lombare direttamente nel liquido cefalorachidiano attorno al midollo spinale, sito della degenerazione dei motoneuroni causata da livelli insufficienti della proteina SMN nei pazienti affetti da SMA.

I risultati finali dello studio di fase III ENDEAR su nusinersen sono stati pubblicati sul NEJM il 14 novembre 2017.

ENDEAR è un studio durato 13 mesi randomizzato, in doppio cieco, controllato con procedura di trattamento simulato (sham) e condotto su pazienti affetti da atrofia muscolare spinale (SMA) a insorgenza infantile. L'analisi conclusiva sull'efficacia ha incluso tutti i pazienti (n = 121) che sono stati sottoposti alla visita finale dopo l'analisi intermedia (n = 78) e hanno avuto l'opportunità di partecipare alla visita di valutazione dopo sei mesi di studio.





I due endpoint primari prestabiliti dello studio ENDEAR erano la percentuale di raggiungimento delle tappe motorie, definita come miglioramenti nelle categorie di tappe motorie nell'Hamersmith Infant Neurological Examination (HINE), e il tempo trascorso prima del decesso o della ventilazione artificiale permanente.

L'analisi finale ha dimostrato che una proporzione maggiore di bambini trattati con nusinersen ha raggiunto le tappe motorie rispetto ai bambini non sottoposti a trattamento (51% vs. 0%, $P < 0,001$), tra cui il pieno controllo della testa, la capacità di girarsi e di stare seduti o in piedi autonomamente.

Inoltre, nusinersen ha soddisfatto l'endpoint primario prestabilito relativo al decesso o alla ventilazione artificiale permanente nell'analisi conclusiva dello studio, dimostrando una riduzione statisticamente significativa del 47% del rischio di decesso o dell'uso della ventilazione permanente assistita ($P=0,005$) e una riduzione del 76% per i soggetti con una durata della malattia più breve.

Nusinersen ha mostrato un profilo beneficio-rischio favorevole. I dati sulla sicurezza erano coerenti con quelli previsti nella popolazione generale di bambini affetti da SMA ed erano simili a quelli riportati in uno studio open-label sulla comparsa della SMA in età infantile.

Terapia genica

Lo scorso novembre è stato pubblicato sul NEJM uno studio di fase 1 su una terapia genica per questa condizione. Nello studio, un vettore virale adeno-associato, contenente il gene SMN1 (scAAV9), è stato somministrato a 15 piccoli pazienti attraverso un'unica infusione endovenosa. In tutti i piccoli pazienti si è registrato un allungamento della sopravvivenza senza dover ricorrere a supporto ventilatorio permanente; molti di loro hanno potuto raggiungere dei traguardi motori importanti come il mantenimento della posizione seduta o addirittura l'acquisizione della stazione eretta e del cammino.

La terapia genica (non ancora approvata) e l'approccio con l'oligonucleotide antisense nusinersen hanno mostrato entrambi di migliorare la funzione motoria nei bambini con SMA1.

Un'indicazione emersa da queste prime esperienze di trattamento è che la risposta migliore si osserva nei pazienti che iniziano precocemente il trattamento. E per confermare la validità di questa osservazione, è stato disegnato un trial apposito, il NURTURE, che sta valutando appunto l'effetto di nusinersen nei soggetti pre-sintomatici.





PHARMASTAR

www.pharmastar.it
Registrazione al Tribunale di Milano
n° 516 del 6 settembre 2007

EDITORE

MedicalStar
Via San Gregorio, 12 - 20124 Milano
info@medicalstar.it - www.medicalstar.it



DIRETTORE RESPONSABILE

Danilo Magliano



PROGETTO E GRAFICA

Francesca Bezzan
www.franbe.it

AVVERTENZE PER I LETTORI

Nessuna parte di questa pubblicazione può essere copiata o riprodotta anche parzialmente senza l'autorizzazione dell'Editore.

L'Editore declina ogni responsabilità derivanti da errori od omissioni in merito a dosaggio o impiego di medicinali o dispositivi medici eventualmente citati negli articoli e invita il lettore a controllare personalmente l'esattezza delle informazioni, facendo riferimento alla bibliografia relativa.

HANNO COLLABORATO ALLO SPECIALE



Elisa Spelta
Giornalista e medical writer



Giuseppe Danilo Norata
*Professore associato di Farmacologia,
Università degli Studi di Milano*



SEGUICI SU



ISCRIVITI ALLA NEWSLETTER



REDAZIONE@PHARMASTAR.IT

PHARMASTAR[★]
il Giornale on-line sui Farmaci
WWW.PHARMASTAR.IT