

REVIEW

BIOMARCATORI FARMACOGENOMICI PER LA PREDIZIONE DI EFFICACIA E SICUREZZA DELLE STATINE

Pharmacogenomic biomarkers for the prediction of statins efficacy and safety

DAMIANO BALDASSARRE^{1,2}, MAURO AMATO², BEATRICE FRIGERIO²,
GUALTIERO COLOMBO², PHILIP F. BINKLEY³, SAURABH R. PANDEY⁴,
ADAM M. SUHY³, KATHERINE HARTMANN³, JOSEPH P. KITZMILLER³

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

²Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milano;

³College of Medicine, The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA;

⁴College of Pharmacy, University of Charleston, Charleston, West Virginia 25304, USA

SUMMARY

Statins have high efficacy for treating hyperlipidemia and are widely prescribed. While most patients benefit from statins, some experience cardiovascular events despite statin pharmacotherapy and others experience adverse effects. Patient response to statins is genetically influenced, and polymorphisms in many genes have been associated with statin dose requirements and clinical outcomes. However, a clinically relevant pharmacogenomics test to guide statin therapy has not yet materialized. This article provides a basic overview of pharmacogenomics, describes several key genes (CETP, HMGCR, SLCO1B1, ABCB1, and CYP3A4/5) influencing the pharmacology of statins, and highlights the difficulties in developing actionable genetic assays to help guide statin pharmacotherapy.

Keywords: *Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase Inhibitors, Biomarkers, Pharmacogenomic, Safety, Efficacy, Polymorphism.*

Malattie cardiovascolari e statine

Le malattie cardiovascolari (CV) sono la principale causa di morbilità e mortalità dei paesi industrializzati. Ad esempio, più di un americano su tre è affetto da una qualche forma di malattia CV e un

decesso su sei è dovuto alla sola malattia coronarica. I costi sanitari superano i 300 miliardi di dollari all'anno (1).

Ne consegue che la malattia CV è senz'altro da considerarsi una delle patologie più diffuse e costose che una nazione debba affrontare. L'efficacia re-

Indirizzo per la corrispondenza

Dr. Damiano Baldassarre
Dipartimento di Scienze Farmacologiche
e Biomolecolari
Università degli Studi di Milano
Via Balzaretti, 9
20133 Milano
E-mail: damiano.baldassarre@unimi.it

Il presente articolo è la traduzione della review:

Kitzmiller JP, Binkley PF, Pandey SR, Suhy AM, Baldassarre D, Hartmann K. Statin pharmacogenomics: pursuing biomarkers for predicting clinical outcomes. *Discov Med.* 2013; 16(86): 45-51. PubMed PMID: 23911231.

Si ringraziano la rivista "Discov Med" e gli altri autori per averne autorizzato la pubblicazione sul "Giornale Italiano dell'Arteriosclerosi".

lativamente elevata ed il profilo di scarsi effetti collaterali hanno contribuito a rendere le statine la classe di farmaci di riferimento per la prevenzione degli eventi cardiaci associati alla presenza di iperlipidemie.

Ampi studi clinici hanno dimostrato, infatti, che le statine riducono il rischio di eventi vascolari maggiori in modo lineare, con una diminuzione del rischio pari al 20% per ogni riduzione di 1 mmol/L di colesterolo associato alle lipoproteine a bassa densità o LDL (Low-Density Lipoprotein) (2).

Ancora oggi, a venticinque anni dall'approvazione della Food and Drug Administration (FDA) americana, le statine restano una pietra miliare del sistema sanitario degli Stati Uniti, con la simvastatina che occupa il terzo posto nella lista dei farmaci più prescritti (3).

La risposta alla terapia con statine è tuttavia influenzata da diversi fattori e soprattutto non è universale: alcuni pazienti non raggiungono il target terapeutico, altri sviluppano eventi clinici a dispetto della terapia ed altri ancora sviluppano effetti collaterali come epatiti o miopatie.

Il presente articolo offre una breve introduzione all'analisi farmacogenomica, descrive una serie di geni che influenzano la farmacologia delle statine e definisce le tendenze, attuali e future, nella ricerca farmacogenomica di questi farmaci.

Nel corso dell'articolo, al fine di aiutare il lettore a familiarizzare con i concetti della ricerca farmacogenomica e con la relativa terminologia, il livello di dettaglio della trattazione dei geni presentati sarà aumentato in modo graduale. Il lettore noterà inoltre che esistono differenze riguardo l'influenza genetica tra i diversi tipi di statine in conseguenza delle loro differenze in termini di struttura chimica, potenza e distribuzione.

Farmacogenomica

La farmacogenomica è la scienza che studia come i fattori genetici influenzino la variabilità inter-individuale della risposta ai farmaci. Poiché molti pazienti, medici e scienziati potrebbero non avere familiarità con questa disciplina e tanto meno con la terminologia specializzata utilizzata in letteratura, di seguito si riporta una breve rassegna della terminologia comunemente utilizzata. Si definisce "genotipo" la sequenza codificante di coppie di basi di DNA per un particolare gene e "fenotipo" il tratto risultante dal prodotto proteico codificato da un gene. Esempi di fenotipi includono il gruppo sanguigno, il colore dei capelli e la capacità di metabolizzazione o di risposta individuale ad una determinata terapia farmacologica. Il nome di un gene è convenzionalmente riportato in corsivo e spesso si riferisce al suo prodotto proteico (ad esempio, il gene *CYP3A5* codifica per l'enzima CYP3A5). Il genotipo è formato da due alleli per ogni gene autosomico, uno di provenienza materna ed uno di provenienza paterna. Gli individui omozigoti possiedono due alleli identici, gli eterozigoti due alleli diversi. L'allele presente con maggior frequenza in una popolazione è definito "wild-type" (selvatico, nell'accezione di normale, non mutato). Le frequenze alleliche spesso variano da una popolazione all'altra. Le variazioni di sequenza più comuni sono i cosiddetti "polimorfismi a singolo nucleotide" o SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms, pronunciato "snips"). Uno SNP consiste nella sostituzione di una singola coppia di basi di DNA che potrebbe risultare in un prodotto genico diverso. Gli SNPs possono essere polimorfismi strutturali dell'RNA (srSNPs), polimorfismi regolatori (rSNPs), o polimorfismi in regioni codificanti (cSNPs). Gli srSNPs alterano

la sintesi e la traduzione dell'mRNA, gli rSNPs alterano la trascrizione, e i cSNPs alterano la sequenza e la funzione delle proteine. Si definisce "aplotipo" la combinazione di alleli o un insieme di SNPs localizzati in un cromosoma in posizioni fra loro vicine ereditati come unica unità. Gli SNPs detti "tag" (etichetta) non alterano necessariamente la funzione di un gene o il suo prodotto proteico. Si tratta di SNPs "campione" associati ad uno o più polimorfismi, conosciuti o sconosciuti, che sono responsabili di uno o più cambiamenti funzionali. Recentemente, è diventato possibile valutare su larga scala le associazioni genetiche con specifici fenotipi, analizzando milioni di SNPs in migliaia di soggetti. Questo approccio, definito studio di associazione su scala genomica o GWAS (dall'inglese Genome-Wide Association Study), ha permesso di identificare numerosissimi geni candidati per caratteri clinici, ma solo pochi hanno trovato una concreta applicazione clinica. Gli SNPs possono essi stessi esercitare un effetto farmacocinetico (cioè, come il corpo metabolizza il farmaco), farmacodinamico (cioè, come il farmaco influenza il corpo), o una combinazione di entrambi gli effetti. Spesso gli SNPs possono agire in concerto con altri geni o con altri fattori genetici come, ad esempio, i promotori o le regioni "enhancer" (potenziatrici). Gli effetti farmacodinamici possono derivare da un effetto farmacocinetico oppure da variazioni in un bersaglio farmacologico (ad esempio, l'HMG-CoA reduttasi è l'enzima bersaglio delle statine). Stabilire un'associazione genotipo-fenotipo può comportare l'effettuazione di studi clinici, studi con animali transgenici o analisi funzionali a livello molecolare e cellulare. Un approccio completo alla ricerca farmacogenomica dovrebbe comprendere l'esame dell'influenza dei geni coinvolti nell'as-

sorbimento, trasporto, metabolismo ed eliminazione di un farmaco come pure lo studio delle proteine coinvolte nel meccanismo d'azione. Seguendo tale approccio, di seguito sarà descritta una serie di geni che influenzano diversi aspetti della farmacologia delle statine.

Proteina di trasposto degli esteri del colesterolo (Cholesterol Ester Transfer Protein; CETP)

L'enzima CETP è coinvolto nel metabolismo del colesterolo, dove svolge funzioni di trasporto degli esteri del colesterolo nel fegato e di scambio di trigliceridi tra le lipoproteine LDL e le lipoproteine ad alta densità (High-Density Lipoprotein; HDL). Varianti di *CETP* sono state associate a differenze nei livelli di colesterolo, negli eventi cardiovascolari e nella risposta alla terapia con statine. I primi studi dimostrarono che i portatori del polimorfismo *Taq 1B* nel gene *CETP* presentavano, rispetto ai non portatori, concentrazioni inferiori di CETP, concentrazioni maggiori di HDL ed un minor rischio di progressione della malattia coronarica (4-6). In un altro studio, tuttavia, fu anche rilevato un risultato inatteso: la mortalità a 10 anni dei portatori di sesso maschile trattati con statine era superiore a quella osservata nei non portatori della variante *Taq 1B* (7). Questi risultati suggeriscono che il trattamento con statine può essere più utile nei soggetti non portatori, a dispetto del fatto che, nel gruppo non trattato, i portatori abbiano un rischio di progressione di malattia coronarica più basso di quello dei non portatori. L'associazione tra lo SNP *Taq 1B*, i livelli di colesterolo HDL ed il rischio di malattia coronarica è stata validata in un'ampia meta-analisi (n=13.677), dalla quale, tuttavia, non emergeva alcuna

evidenza di un'interazione tra il polimorfismo e la terapia con statine (8). Seppur argomento di discussione, il polimorfismo *Taq 1B* è ora considerato come uno SNP "tag", poiché gli studi *in vitro* non sono riusciti a fornire una spiegazione meccanicistica o funzionale che giustificasse la sua associazione con le differenze osservate in termini di livelli di colesterolo, di rischio cardiovascolare e di risposta alle statine.

Recentemente, sono state identificate due varianti regolatorie nel gene *CETP*, uno SNP nell'esone 9 che aumenta la formazione di un'isoforma di "splicing" (forma alternativa di giunzione tra esoni) non funzionale o dominante-negativa, e SNPs nel promotore e nelle regioni "enhancer" (potenziatrici) che ne influenzano la trascrizione. Entrambe le varianti sono significativamente associate ai livelli di colesterolo e al rischio cardiovascolare sesso-dipendente (9). La loro associazione con la risposta alla terapia con statine è attualmente in fase di studio in diverse coorti di pazienti. Ci sono buone probabilità che ulteriori studi sul gene *CETP* possano fornire le conoscenze necessarie per lo sviluppo di un test clinico capace di identificare a priori i soggetti nei quali una terapia con statine ha scarsa probabilità di successo.

HMG CoA Reduttasi (HMGCR)

L'enzima HMGCR regola il passaggio limitante nel processo di sintesi del colesterolo e, in quanto tale, rappresenta il principale bersaglio delle statine. Inibendo l'attività di HMGCR, le statine inducono una riduzione della sintesi intra-epatica di colesterolo. Tale riduzione, a sua volta, induce un aumento del trasporto di colesterolo dal sangue al fegato e la conseguente

riduzione delle concentrazioni di colesterolo plasmatico si associa ad una rallentata progressione dell'aterosclerosi. Varianti genetiche di *HMGCR*, tuttavia, possono associarsi a risposte significativamente attenuate alla terapia con statine. Ad oggi sono stati descritti circa dieci aplotipi del gene *HMGCR*; fra questi l'aplotipo 7 (H7) è definito dai seguenti tre SNPs: rs17244841, rs3846662 e rs17238540 (10). rs# è un numero di identificazione univoco per i polimorfismi genetici schedati nel "Single Nucleotide Polymorphism Database" (dbSNP), una banca dati curata dal National Center for Biotechnology Information (NCBI) in collaborazione con il National Human Genome Research Institute (NHGRI). La variante genetica associata all'aplotipo H7 influenza uno "splicing" (giunzione) alternativo dell'mRNA di *HMGCR*, che ha come effetto una riduzione della sensibilità alle statine. Negli studi PRINCE (Pravastatin Inflammation/CRP Evaluation) e CAP (Cholesterol and Pharmacogenomics) e nell'analisi del database GoDARTS (banca dati Genetics of Diabetes Audit and Research in Tayside Scotland) i portatori dell'aplotipo H7 mostravano una diminuita risposta alle statine. In particolare, la riduzione del colesterolo LDL nei portatori di H7 era inferiore di circa il 20% e la probabilità di raggiungere il target predefinito dei livelli di colesterolo era inferiore di circa il 50% rispetto ai non-portatori (10-12). Questi risultati non hanno, tuttavia, trovato conferma negli studi ACCESS (Atorvastatin Comparative Cholesterol Efficacy and Safety Study), ALERT (Assessment of Lescol in Renal Transplantation), PROPSEER (Prospective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk), o TNT (Treatment to New Targets) (13-16). La variazione della risposta alla terapia con statine è spiegata meglio dagli aplotipi piuttosto che dai sin-

sanguigno alle cellule epatiche. La principale azione ipolipemizzante delle statine, ossia l'inibizione competitiva dell'enzima HMGCR, avviene all'interno degli epatociti. Varianti di *SLCO1B1* del tipo LOF (Loss-Of-Function = perdita della funzione) o del tipo DOF (Decrease-Of-Function = diminuzione della funzione) dovrebbero, almeno in teoria, comportare una minor efficacia della terapia. Riduzioni significative dell'efficacia non sono tuttavia risultate essere associate ad alcuna variante di *SLCO1B1* (19, 20).

È stato, invece, dimostrato che alcune varianti alleliche di *SLCO1B1* possono avere una significativa influenza sulla farmacocinetica. L'area sotto la curva (AUC) concentrazione-tempo nei portatori di varianti alleliche di *SLCO1B1* era infatti circa doppia ($n=41$, $p<0,01$) rispetto a quella dei portatori omozigoti dell'allele "wild-type" (21). Portatori omozigoti registrati nel database GoDARTS avevano una probabilità tre volte superiore ($n=4.340$, $p<0,01$) di presentare intolleranza alle statine, documentata da un aumento della concentrazione sierica di CK oltre il limite di normalità o da un aumento della concentrazione di alanina aminotransferasi 1,5 volte superiore alla norma (22).

Una ricerca GWAS in pazienti in trattamento con 80 mg al giorno di simvastatina ha mostrato che, rispetto agli omozigoti per l'allele "wild-type", i portatori eterozigoti e omozigoti di una variante allelica *SLCO1B1* avevano una prevalenza di miopia maggiore rispettivamente di 4,5 e 16,9 volte ($n=175$, $p<0,01$ dopo correzione per confronti multipli). Per gli individui che stavano assumendo solo 40 mg di farmaco al giorno, gli Odds Ratio (OR; termine inglese intraducibile in italiano che significa proporzione del rischio di un dato esito per una determinata esposizione/stato) erano pari a 2,6

per i portatori eterozigoti e a 5,2 per gli omozigoti (23). In uno studio caso-controllo ($n=108$), tale associazione è stata replicata per i pazienti che assumevano simvastatina (OR: 3,2, $p<0,05$), ma non per quelli che assumevano atorvastatina (OR: 4,5, $p=0,48$) (24). Sebbene l'associazione tra la variante *SLCO1B1* e la tossicità muscolare imputabile a simvastatina sia ben supportata dalle evidenze, un evento avverso può manifestarsi anche in assenza della variante allelica. Altre varianti potenzialmente deleterie in *SLCO1B1* o in altri geni possono aumentare l'esposizione sistemica di un organismo alle statine, aumentando così il rischio di sviluppare tossicità muscolare.

ATP-binding Cassette (cassetta di legame per ATP), Sottofamiglia B1 (ABCB1)

Come illustrato in *Figura 1*, le statine ed i loro metaboliti sono eliminati attraverso la bile e le urine. *ABCB1* trasporta statine e metaboliti dagli epatociti alla bile e dalle cellule renali all'urina. È stato dimostrato che tre SNPs (rs1128503, rs2032582 e rs1045642) esercitano una influenza significativa di tipo diretto sulla farmacocinetica e di tipo indiretto sulla farmacodinamica delle statine. Questi polimorfismi sono anche indicati come: c.1236C>T, c.2677G>T/A e c.3435C>T di *ABCB1*, riferendosi alla sostituzione di basi nel DNA ed alla loro posizione nella sequenza di cDNA (DNA complementare) del gene. Per esempio, c.1236C>T indica che il polimorfismo ha una timina al posto di una di citosina in posizione 1236 della sequenza di basi del cDNA di *ABCB1*. Lo SNP C3435T, da solo, è stato anche associato ad una diminuita stabilità dell'mRNA di *ABCB1* che, di conseguenza, porta

ad una ridotta espressione di *ABCB1* (25). In combinazione con lo SNP 1236, con lo SNP 2677 o con entrambi, lo SNP 3435 influenza la dinamica di utilizzo dei codoni e la tempistica del cosiddetto “cotranslational folding” (ripiegamento proteico cotraslazionale), portando ad alterazioni di struttura e funzione dei trasportatori. Gli individui che presentavano il pattern genotipico a 3 loci (T;T)-(T;T)-(T;T), noto anche come aplotipo “TTT”, avevano una AUC aumentata del 60% per il metabolita della simvastatina ($p=0,039$) e aumentata del 55% per il metabolita dell’atorvastatina ($p<0,025$), rispetto a quelli con aplotipo CGT (26). La genotipizzazione di *ABCB1* non è effettuata di routine; tuttavia, le indagini che combinano la valutazione di *ABCB1* con quella di altri geni noti influenzare la farmacocinetica delle statine (ad esempio, *SLCO1B1* e *CYP3A*) hanno lo scopo di sviluppare test clinicamente rilevanti per la selezione della dose di statina più appropriata e per evitare l’insorgenza di tossicità.

Citocromo P450, Famiglia 3, Sottofamiglia A (CYP3A)

Gli enzimi *CYP3A* sono coinvolti nel metabolismo di circa metà dei farmaci più comunemente prescritti. Tra le statine, questi enzimi metabolizzano atorvastatina, lovastatina e simvastatina. Il *CYP3A4* è il membro più importante della famiglia di *CYP3A* ed un suo allele DOF, il *CYP3A4*22*, è stato recentemente caratterizzato. La nomenclatura degli alleli sviluppata per gli enzimi CYP identifica gli SNPs significativi mediante un numero preceduto dal simbolo “*” (che si pronuncia “star”). La presenza di questo simbolo suggerisce che sufficienti evidenze scientifiche sono disponibili ri-

guardo funzionalità, prevalenza e rilevanza clinica del polimorfismo (27). La designazione “*1” è generalmente assegnata all’allele “wild-type”, ovvero quello che presenta un “funzionamento normale”, ed a un polimorfismo può essere attribuita la designazione “rs#” o “star” (seguita da un numero identificativo). Il livello e l’attività dell’enzima *CYP3A4* erano più elevati nei pazienti omozigoti “wild-type” che nei portatori dell’allele *CYP3A4*22*. Di conseguenza, per ottenere un controllo ottimale dei lipidi, nei portatori dell’allele DOF era sufficiente una dose di statina pari al 20-60% ($n=235$, $p<0,05$) di quella necessaria ai pazienti omozigoti “wild-type” che assumevano dosi stabili di atorvastatina, simvastatina o lovastatina (28). Nei portatori dell’allele *CYP3A4*22*, infatti, le concentrazioni seriche di simvastatina e del suo metabolita attivo, misurate allo “steady-state” (cioè, al raggiungimento di un livello stazionario), risultavano più elevate del 50% circa ($n\sim 800$, $p<0,05$) rispetto a pazienti omozigoti “wild-type” (Kitzmiller JP, dati non ancora pubblicati). È stata inoltre riportata una significativa associazione tra l’allele *22 e una maggiore risposta ipolipemizzante alla simvastatina, (29) e che i portatori dell’allele *CYP3A4*22* potrebbero presentare un rischio più elevato ($n\sim 300$, $p\sim 0,06$) di sviluppare miopia da statine (Kitzmiller J.P., dati non ancora pubblicati). Circa il 7% dei caucasici possiede almeno un allele *CYP3A4*22*; in popolazioni di pazienti non caucasici la frequenza dell’allele DOF non è stata ancora ben caratterizzata.

Sebbene alcuni studi *in vitro* supportino in modo consistente solo un ruolo limitato di *CYP3A5* nel metabolismo delle statine (30), alcuni ricercatori hanno rilevato associazioni significative tra il gene *CYP3A5* e farmacocinetica e farmacodinamica delle statine. Il *CYP3A5*1* è

l'unico allele che produce livelli elevati di mRNA di lunghezza completa e di proteina funzionale di *CYP3A5*. Approssimativamente, sono stati descritti circa una dozzina di alleli *CYP3A5* e, tra questi, il *CYP3A5*3* è l'allele LOF più comune. Rispetto agli omozigoti *CYP3A5*1*, l'esposizione sistemica alla simvastatina era aumentata negli omozigoti *CYP3A5*3* (31). Negli omozigoti *CYP3A5*1* sono state anche osservate risposte ipolipemizzanti ridotte (32, 33). Per contro, altri risultati suggeriscono che il *CYP3A5* non influenza né la farmacocinetica né la farmacodinamica delle statine. In questi studi, infatti, l'esposizione sistemica al metabolita acido e biologicamente attivo dell'atorvastatina non era significativamente associata al genotipo del *CYP3A5* (34) e non si osservava alcuna associazione significativa tra il *CYP3A5*3* e l'efficacia o la tollerabilità della simvastatina (35). Come mostrato in *Figura 1*, altri enzimi, tra i quali il *CYP2C* e l'Uridina '5 Difosfoglucuroniltransferasi (UGT), sono coinvolti nel metabolismo di alcune statine. Varianti genetiche riguardanti tali enzimi sembrano tuttavia associarsi ad effetti di minore rilevanza per quanto riguarda la farmacologia delle statine; gli sforzi dedicati al loro studio sono, peraltro, stati di minor entità.

Tendenze attuali e prospettive future

Al fine di studiare l'impatto dei polimorfismi genetici sulla farmacoterapia delle statine, in varie popolazioni di pazienti negli Stati Uniti e nel mondo sono stati condotti numerosi studi retrospettivi, prospettici, caso-controllo, trasversali, sia con approccio di tipo gene-candidato che su scala genomica. Oltre a quelli descritti

in questa review, diversi altri geni-chiave (ad esempio, *APOE*, *LDL-R*, *PCSK9*, *KIF6* e *CLMN*) hanno influenze significative sulla farmacologia delle statine, e sono state condotte analisi al fine di integrarne l'effetto e di identificarne le eventuali interazioni. A dispetto di ciò, a tutt'oggi non è ancora stato messo a punto alcun test farmacogenomico sulle statine che abbia dimostrato una qualche rilevanza clinica. Presi singolarmente, nessuno dei geni valutati ha un impatto clinico tale da giustificare la valutazione di routine. Uno studio che coinvolga una grande popolazione di pazienti e che affronti il problema con un approccio multi-genico potrebbe, almeno potenzialmente, fornire indicazioni utili sulla farmacoterapia delle statine, analogamente a quanto effettuato per la terapia con il warfarin e riportato sul sito www.warfarindosing.org.

I dati di farmacogenomica forniti in questo sito, infatti, rappresentano una guida per il dosaggio del warfarin basata non solo su fattori clinici, sulle eventuali interazioni con i farmaci concomitanti e sulle co-morbidità, ma anche sui genotipi dei geni *VKORC1*, *CYP2C9*, *CYP4F2* e *GGCX*. La popolarità di questo sito tra medici e pazienti è aumentata e i foglietti illustrativi dei farmaci a base di warfarin approvati dalla FDA riportano la raccomandazione di prendere in considerazione il genotipo di *CYP2C9* e *VKORC1* per scegliere la dose iniziale da somministrare al paziente (36). Con il procedere della ricerca genetica correlata alle statine, sarebbe opportuno costruire un approccio multi-genico analogo includendo anche i fattori clinici, per aiutare i medici a rispondere alle seguenti fondamentali domande: Con che probabilità il mio paziente trarrà beneficio dall'assunzione di una statina? Qual è la statina più adatta al mio paziente? Qual è la dose di stati-

na che dovrei prescrivere inizialmente? Il rischio individuale del mio paziente di sviluppare eventi avversi supera i benefici attesi con questa terapia? Il mio paziente dovrebbe essere monitorato con maggiore frequenza per quanto riguarda gli eventi avversi?

L'analisi di studi clinici recenti riguardanti statine e farmacogenomica fornisce le basi per qualche previsione. Il sito www.ClinicalTrials.gov ospita un registro ed un database contenente risultati di studi clinici condotti in tutto il mondo, con finanziamenti sia pubblici che privati. La registrazione degli studi clinici sponsorizzati dall'industria farmaceutica è obbligatoria o quanto meno fortemente raccomandata dalle seguenti organizzazioni nazionali e internazionali: Food and Drug Administration statunitense, World Health Organization, National Institutes of Health, World Medical Association, e International Committee of Medical Journal Editors (37). Circa 1.500 degli studi attualmente registrati riguardano una statina, e 20 di essi includono una componente genetica primaria.

L'analisi di un campione casuale dei rimanenti studi sulle statine registrati in questo sito suggerisce che circa il 10% di questi include, tra gli obiettivi secondari, la valutazione di fattori genetici. La statina più studiata è l'atorvastatina, con 576 studi registrati, seguita da simvastatina, rosuvastatina, pravastatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina e cerivastatina, per le quali sono stati registrati rispettivamente 422, 282, 128, 58, 53, 49, e 1 studi clinici. Dei trials registrati condotti su statine, il 16% sono studi di fase 1, il 20% di fase 2, il 30% di fase 3 ed il 34% di fase 4. Tra questi trials, il 35% dichiara di aver ricevuto finanziamenti dall'industria, il 4% finanziamenti di provenienza federale, il 17% finanziamenti di origine mista

industriale-federale, ed il 44% da altri tipi di fonti (37).

Oggi esistono numerosi database di grandi dimensioni contenenti dati di associazione genotipo-fenotipo relativi alla farmacoterapia delle statine e molti altri sono tuttora in via di sviluppo. La combinazione di questi dati potrebbe fornire vantaggi per il raggiungimento dell'obiettivo primario della ricerca sulla farmacogenomica delle statine, ossia lo sviluppo di test farmacogenomici di interesse e utilità clinica che siano di aiuto per il medico nelle scelte relative alla farmacoterapia delle statine.

Una delle sfide maggiori per l'aggregazione di questi dati riguarda le differenze tra i domini fenotipici studiati, predefiniti e limitati. L'approccio GWAS, tipicamente, determina associazioni tra la variazione di milioni di SNPs e pochi fenotipi predefiniti. Un metodo alternativo di recente sviluppo, il cosiddetto "PheWAS" (Phenome-Wide Association Study, studio di associazioni sull'intero "fenoma"), utilizza tutte le informazioni fenotipiche e tutte le varianti genetiche disponibili al fine di stimare le associazioni tra genotipi e fenotipi (38).

Combinando e analizzando una maggior varietà di fenotipi, tale approccio consente una visione più ampia delle relazioni tra variazioni genetiche e network fenotipici. Metodi statistici flessibili e adattabili come l'approccio PheWAS possono indubbiamente portare ad avanzamenti significativi nello sviluppo di tests farmacogenomici, ma è altrettanto indubbio che gli studi randomizzati prospettici, specificamente disegnati al fine di valutare il miglioramento nell'outcome del paziente, resteranno il vero *gold standard* per determinare il reale significato clinico di un test farmacogenomico.

In modo forse discutibile, la maggior

parte degli studi clinici e la ricerca farmacogenomica si sono focalizzati sulla valutazione dell'efficacia dell'azione ipolipemizzante delle statine. Tuttavia, i benefici complessivi della terapia con statine sembrano andare oltre quelli previsti dalla mera variazione dei livelli lipidici. Studi recenti hanno identificato diversi effetti "pleiotropici" (cioè, effetti differenti da quelli dell'indicazione iniziale del farmaco) delle statine, tra cui la capacità di aumentare la disponibilità di ossido nitrico endogeno, di migliorare la stabilità di placca e la funzione endoteliale e di diminuire l'infiammazione. È logico pensare che anche gli effetti pleiotropici

delle statine possano essere influenzati geneticamente e che futuri studi clinici e ricerche di farmacogenomica sulle statine dovrebbero valutare le potenziali associazioni genotipo-fenotipo tenendo conto anche di questi aspetti.

Ringraziamenti

Si ringrazia la NIH (National Institutes of Health) per le sovvenzioni K23 GM100372 e U01 GM092655 che hanno sostenuto gli autori nella scrittura di questa review.

Dichiarazione di conflitti di interesse

Nessuno

Glossario

ATCB1: ATP-binding Cassette Subfamily B1 (cassetta di legame per ATP, Sottofamiglia B1)

AUC: Area Under the Curve (area sotto la curva)

cDNA: DNA complementare

CETP: Cholesterol Ester Transfer Protein (Proteina di trasporto degli esteri del colesterolo)

CK: creatin-chinasi

cSNPs: polimorfismi in regioni codificanti

CV: Malattia Cardiovascolare

CYP3A: Citocromo P450, Famiglia 3, Sottofamiglia A

dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism Database

DOF: Decrease-Of-Function (diminuzione della funzione)

Enhancer: regione potenziatrice

FDA: Food and Drug Administration

Gene "wild-type": Gene selvatico (nell'accezione di normale, non mutato)

GoDARTS: banca dati Genetics of Diabetes Audit and Research in Tayside Scotland

GWAS: Genome-Wide Association Study (studio di associazione su scala genomica)

HDL: High-Density Lipoprotein (lipoproteine ad alta densità)

HMGCR: Hydroxy-MethylGlutaryl-Coenzyme A Reductase (enzima che regola la sintesi di colesterolo e bersaglio delle statine)

IMNM: Immune-Mediated Necrotizing Myopathy (miopatia necrotizzante immuno-mediata)

LDL: Low-Density Lipoprotein (lipoproteine a bassa densità)

LOF: Loss-Of-Function (perdita della funzione)

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NHGRI: National Human Genome Research Institute

OR: Odds Ratio (termine inglese intraducibile in italiano che significa proporzione del rischio di un dato esito per una determinata esposizione/stato)

PhEWAS: Phenome-Wide Association Study (studio di associazioni sull'intero "fenoma")

rSNPs: polimorfismi regolatori

SLCO1B1: Solute Carrier Organic Anion Transporter Family, Member 1B1 (Famiglia di trasportatori di soluti organici anionici, Membro 1B1)

SNPs "tag": SNPs etichetta

SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms (Polimorfismi a singolo nucleotide)

srSNPs: polimorfismi strutturali dell'RNA

UGT: Uridina '5 Difosfo-glucuroniltransferasi

Questionario di auto-apprendimento:**1) Che cos'è un aplotipo?**

- a) è un polimorfismo a singolo nucleotide.
- b) *Una combinazione di alleli o un insieme di SNPs localizzati in un cromosoma in posizioni fra loro vicine ed ereditati come unica unità.*
- c) è una mutazione genica in un gene codificante per un enzima metabolico.
- d) è una malattia genetica.

2) Che cos'è la farmacogenomica?

- a) *è la scienza che studia come i fattori genetici influenzano la variabilità inter-individuale della risposta ai farmaci.*
- b) è la scienza che studia come i farmaci possono modificare il genoma umano.
- c) *è la scienza che studia come i farmaci influenzano la variabilità inter-individuale del metabolismo.*
- c) è la scienza che studia cosa il farmaco fa al corpo.

3) Cosa si intende per HMG CoA Reduttasi?

- a) è un enzima che stimola la sintesi del colesterolo.
- b) è un enzima della famiglia dei citocromi P450 ed è il principale bersaglio delle statine.

- c) è un enzima che regola il passaggio limitante nel processo di sintesi del colesterolo ed è il principale bersaglio delle statine.
- d) *è un enzima che, metilando l'HMG CoA, inibisce la sintesi del colesterolo.*

4) Che cos'è un gene "wild-type"?

- a) è un gene selvaggio, ossia quello che crea effetti più deleteri.
- b) è l'allele presente con minor frequenza in una popolazione.
- c) è un gene rilevabile solo in organismi che vivono allo stato selvatico.
- d) *è l'allele presente con maggior frequenza in una popolazione, definito gene selvatico nell'accezione di normale, non mutato.*

5) Cosa sono gli enzimi CYP3A?

- a) sono enzimi della famiglia dei citocromi P450 di scarso interesse in quanto poco coinvolti nel metabolismo dei farmaci.
- b) sono enzimi che modulano la trascrizione genica.
- c) *sono enzimi della famiglia dei citocromi P450 coinvolti nel metabolismo di circa metà dei farmaci più comunemente prescritti.*
- d) sono enzimi deputati all'assorbimento dei farmaci.

RIASSUNTO

Le statine, indicate per il trattamento delle iperlipidemie e per la prevenzione delle malattie cardiovascolari, sono fra le classi di farmaci più frequentemente prescritte. A dispetto della loro ormai riconosciuta efficacia, una percentuale rilevante dei pazienti trattati con questi farmaci continua a progredire verso la malattia cardiovascolare conclamata. È quindi pensiero comune che diversi fattori genetici possano contribuire sostanzialmente al risultato di questo trattamento terapeutico. Effettivamente, diversi geni candidati sono stati associati al dosaggio di statina necessario e al risultato terapeutico. Ciò nonostante, non esiste ad oggi alcun test farmacogenomico specifico che permetta di guidare il medico nelle scelte riguardanti la terapia con questi farmaci. Nel presente articolo, oltre a definire la terminologia di base della farmacogenomica, saranno descritti i geni candidati di maggior interesse (CETP, HMGCR, SLCO1B1, ABCB1 e CYP3A4/5) e i più recenti studi effettuati al fine di soddisfare la crescente richiesta di nuovi marcatori farmacogenomici capaci di predire la risposta al trattamento con una statina.

Parole chiave: Farmacogenomica, statine, malattie cardiovascolari.

Bibliografia

- Gaziano TA, Bitton A, Anand S, et al. Growing epidemic of coronary heart disease in low- and middle-income countries. *Curr Probl Cardiol.* 2010; 35(2): 72-115.
- Amarenco P, Labreuche J. Lipid management in the prevention of stroke: review and updated meta-analysis of statins for stroke prevention. *Lancet Neurol.* 2009; 8(5): 453-463.
- IMS Institute for Healthcare Informatics. Declining Medicine Use and Costs: For Better or Worse? A Review of the Use of Medicines in the United States in 2012. 2013 (Accessed Jul. 1, 2013, from <http://www.imshealth.com>).
- Freeman DJ, Griffin BA, Holmes AP, et al. Regulation of plasma HDL cholesterol and subfraction distribution by genetic and environmental factors. Associations between the TaqI B RFLP in the CETP gene and smoking and obesity. *Arterioscler Thromb.* 1994; 14(3): 336-344.
- Kuivenhoven JA, Jukema JW, Zwinderman AH, et al. The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. The Regression Growth Evaluation Statin Study Group. *N Engl J Med.* 1998; 338(2): 86-93.
- Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, et al. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet.* 2008; 40(2): 161-169.
- Regieli JJ, Jukema JW, Grobbee DE, et al. CETP genotype predicts increased mortality in statin-treated men with proven cardiovascular disease: an adverse pharmacogenetic interaction. *Eur Heart J.* 2008; 29(22): 2792-2799.
- Boekholdt SM, Sacks FM, Jukema JW, et al. Cholesteryl ester transfer protein TaqIB variant, high-density lipoprotein cholesterol levels, cardiovascular risk, and efficacy of pravastatin treatment: individual patient meta-analysis of 13,677 subjects. *Circulation.* 2005; 111(3): 278-287.
- Papp AC, Pinsonneault JK, Wang D, et al. Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) polymorphisms affect mRNA splicing, HDL levels, and sex-dependent cardiovascular risk. *PLoS One.* 2012; 7(3): e31930.
- Krauss RM, Mangravite LM, Smith JD, et al. Variation in the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase gene is associated with racial differences in low-density lipoprotein cholesterol response to simvastatin treatment. *Circulation.* 2008; 117(12): 1537-1544.
- Chasman DI, Posada D, Subrahmanyam L, et al. Pharmacogenetic study of statin therapy and cholesterol reduction. *JAMA.* 2004; 291(23): 2821-2827.
- Donnelly LA, Doney AS, Dannfald J, et al. A paucimorphic variant in the HMG-CoA reductase gene is associated with lipid-lowering response to statin treatment in diabetes: a GoDARTS study. *Pharmacogenet Genomics.* 2008; 18(12): 1021-1026.
- Thompson JF, Man M, Johnson KJ, et al. An association study of 43 SNPs in 16 candidate genes with atorvastatin response. *Pharmacogenomics J.* 5(6): 352-358, 2005.
- Singer JB, Holdaas H, Jardine AG, et al. Genetic analysis of fluvastatin response and dyslipidemia in renal transplant recipients. *J Lipid Res.* 2007; 48(9): 2072-2078.
- Polisecki E, Muallem H, Maeda N, et al. Genetic variation at the LDL receptor and HMG-CoA reductase gene loci, lipid levels, statin response, and cardiovascular disease incidence in PROSPER. *Atherosclerosis.* 2008; 200(1): 109-114.
- Thompson JF, Hyde CL, Wood LS, et al. Comprehensive whole-genome and candidate gene analysis for response to statin therapy in the Treating to New Targets (TNT) cohort. *Circ Cardiovasc Genet.* 2009; 2(2): 173-181.
- Mammen AL, Chung T, Christopher-Stine L, et al. Autoantibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in patients with statin-associated autoimmune myopathy. *Arthritis Rheum.* 2011; 63(3): 713-721.
- Werner JL, Christopher-Stine L, Ghazarian SR, et al. Antibody levels correlate with creatine kinase levels and strength in anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-associated autoimmune myopathy. *Arthritis Rheum.* 2012; 64(12): 4087-4093.

19. Peters BJ, Rodin AS, Klungel OH, et al. Pharmacogenetic interactions between ABCB1 and SLCO1B1 tagging SNPs and the effectiveness of statins in the prevention of myocardial infarction. *Pharmacogenomics*. 2010; 11(8): 1065-1076.
20. Yang GP, Yuan H, Tang B, et al. Lack of effect of genetic polymorphisms of SLCO1B1 on the lipid-lowering response to pitavastatin in Chinese patients. *Acta Pharmacol Sin*. 2010; 31(3): 382-386.
21. Niemi M, Schaeffeler E, Lang T, et al. High plasma pravastatin concentrations are associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide-C (OATP-C, SLCO1B1). *Pharmacogenetics*. 2004; 14(7): 429-440.
22. Donnelly LA, Doney AS, Tavendale R, et al. Common nonsynonymous substitutions in SLCO1B1 predispose to statin intolerance in routinely treated individuals with type 2 diabetes: a go-DARTS study. *Clin Pharmacol Ther*. 2011; 89(2): 210-216.
23. Link E, Parish S, Armitage J, et al. SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy—a genomewide study. *N Engl J Med*. 2008; 359(8): 789-799.
24. Brunham LR, Lansberg PJ, Zhang L, et al. Differential effect of the rs4149056 variant in SLCO1B1 on myopathy associated with simvastatin and atorvastatin. *Pharmacogenomics J*. 2012; 12(3): 233-237.
25. Wang D, Johnson AD, Papp AC, et al. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics*. 2005; 15(10): 693-704.
26. Keskitalo JE, Kurkinen KJ, Neuvoneni PJ, et al. ABCB1 haplotypes differentially affect the pharmacokinetics of the acid and lactone forms of simvastatin and atorvastatin. *Clin Pharmacol Ther*. 2008; 84(4): 457-461.
27. Sim SC. Allele Nomenclature for Cytochrome P450 Enzymes. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database. 2011 (Accessed Jul. 1, 2013, from <http://cypalleles.ki.se>).
28. Wang D, Guo Y, Wrighton SA, et al. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J*. 2011; 11(4): 274-286.
29. Elens L, Becker ML, Haufroid V, et al. Novel CYP3A4 intron 6 single nucleotide polymorphism is associated with simvastatin-mediated cholesterol reduction in the Rotterdam Study. *Pharmacogenet Genomics*. 2011; 21(12): 861-866.
30. Park JE, Kim KB, Bae SK, et al. Contribution of cytochrome P450 3A4 and 3A5 to the metabolism of atorvastatin. *Xenobiotica*. 2008; 38(9): 1240-1251.
31. Kim KA, Park PW, Lee OJ, et al. Effect of polymorphic CYP3A5 genotype on the single-dose simvastatin pharmacokinetics in healthy subjects. *J Clin Pharmacol*. 2007; 47(1): 87-93.
32. Kivisto KT, Niemi M, Schaeffeler E, et al. Lipid-lowering response to statins is affected by CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics*. 2004; 14(8): 523-525.
33. Shin J, Pauly DF, Pacanowski MA, et al. Effect of cytochrome P450 3A5 genotype on atorvastatin pharmacokinetics and its interaction with clarithromycin. *Pharmacotherapy*. 2011; 31(10): 942-950.
34. Willrich MA, Hirata MH, Genvigir FD, et al. CYP3A53A allele is associated with reduced lowering-lipid response to atorvastatin in individuals with hypercholesterolemia. *Clin Chim Acta*. 2008; 398(1-2): 15-20.
35. Fiegenbaum M, da Silveira FR, Van der Sand CR, et al. The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment. *Clin Pharmacol Ther*. 2005; 78(5): 551-558.
36. Bristol-Myers-Squibb. Coumadin (warfarin sodium). Prescribing Information., 2010.
37. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. 2012. (Accessed Jul. 1, 2013, from <http://clinicaltrials.gov>).
38. Pendergrass SA, Brown-Gentry K, Dudek SM, et al. The use of phenome-wide association studies (PheWAS) for exploration of novel genotype-phenotype relationships and pleiotropy discovery. *Genet Epidemiol*. 2011; 35(5): 410-422.