

## AGGIORNAMENTO

# APOLIPOPROTEINA C-III (APOC-III): UN NUOVO BERSAGLIO TERAPEUTICO PER IL TRATTAMENTO DELLA IPERTRIGLICERIDEMIA

## Apolipoprotein C-III (apoC-III): a new therapeutic target in the treatment of hypertriglyceridemia

SEBASTIANO CALANDRA<sup>1</sup>, PATRIZIA TARUGI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena

### SUMMARY

Apolipoprotein C-III (apoC-III) was identified as a protein constituent of triglyceride rich lipoproteins (TGR-Lp) more than 40 years ago. The first function assigned to apoC-III was the non-competitive inhibition of Lipoprotein Lipase (LPL). ApoC-III was also found to reduce the removal of TGR-Lp from the plasma compartment by preventing the interaction of apolipoprotein E present in these lipoproteins with specific receptors (LDLR and LRP1) on the plasma membrane of hepatocytes. The epidemiological studies, which have demonstrated that plasma triglyceride level is an independent risk factor for coronary heart disease (CHD), have also shown a strict association between plasma levels of triglycerides and apoC-III. For this reason the plasma level of apoC-III has become a strong predictor of CHD risk. Recent genetic studies have shown that heterozygous carriers of APOC3 gene mutations which cause the loss of function of apoC-III (LOF mutations) have lower plasma levels of triglycerides, apoC-III and LDL-C and higher levels of HDL-C than non-carriers. This plasma lipid profile found in mutation carriers was associated with a substantial reduction of CHD risk. These observations have suggested that apoC-III might be a target in the treatment of hypertriglyceridemias. This idea has prompted the development of anti-sense oligonucleotides (ASO) anti apoC-III which have been tested in animal models. These pre-clinical studies showed that ASO induced a substantial reduction of plasma triglyceride and apoC-III. Safety and efficacy of this drug were confirmed in phase 1 human studies which paved the way to phase 2 studies. A short term treatment of three patients affected by severe hypertriglyceridemia (Familial Chilomicronemia) resulted in a marked reduction of plasma triglycerides and apoC-III with no relevant side effects. In view of these findings the anti apoC-III ASO might be used in patients with familial chilomicronemia to reduce the risk of pancreatitis linked to the severe hypertriglyceridemia and in patients with moderate hypertriglyceridemia to reduce the CHD risk.

**Keywords:** *apolipoprotein C-III; hypertriglyceridemia; lipoprotein lipase; APOC3 gene; mendelian randomization, antisense oligonucleotides.*

### Indirizzo per la corrispondenza

Sebastiano Calandra  
Dipartimento di Scienze Biomediche Metaboliche  
e Neuroscienze Università di Modena  
e Reggio Emilia  
Via Campi, 287 - 41125 Modena  
email: sebcald@unimore.it

### Apolipoproteina C-III

L'Apolipoproteina C-III (apoC-III) è una piccola glicoproteina costituita da 79 aminoacidi nella sua forma matura (e da 99 aminoacidi nella forma di pre-proteina).

na precursore), che costituiscono 6 alfa eliche anfipatiche, capaci di legare lipidi e trasportarli in un ambiente acquoso. L'apoC-III è sintetizzata nel fegato ed in misura minore nell'intestino. La sua concentrazione plasmatica varia da 8-10 mg/dl nei soggetti normolipidemicici, fino a 30 mg/dl ed oltre in pazienti con ipertrigliceridemia (1, 2).

È presente nel plasma in tre isoforme che differiscono per il contenuto in acido sialico. La isoforma apoC-III<sub>0</sub> non contiene acido sialico, mentre le isoforme apoC-III<sub>1</sub> ed apoC-III<sub>2</sub> legano uno o due molecole di acido sialico rispettivamente. Le isoforme apoC-III<sub>1</sub> ed apoC-III<sub>2</sub> rappresentano >90% dell'apoC-III presente nel plasma. L'apoC-III è presente in tutte le classi di lipoproteine, ma particolarmente nei chilomicroni, nelle VLDL, nei loro remnants e nelle HDL.

Durante l'idrolisi dei trigliceridi (TG) delle VLDL e dei chilomicroni ad opera della Lipasi Lipoproteica (LPL), l'apoC-III si trasferisce dalle VLDL alle HDL per poi essere ritrasferita su altre molecole di VLDL neo-secrete (1, 2). Nei soggetti normo-trigliceridemicici la maggior parte dell'apoC-III si trova sulla superficie delle HDL; queste lipoproteine di fatto rappresentano il "reservoir" di apoC-III nel plasma umano. Nei soggetti iper-trigliceridemicici la maggior parte di apoC-III è sulle VLDL.

Nel caso di soggetti normo-trigliceridemicici ogni molecola di VLDL contiene 25 molecole di apoC-III; questo valore si raddoppia nel caso di VLDL di soggetti iper-trigliceridemicici (1, 2).

Il gene codificante l'apoC-III (gene *APOC3*) si trova prossimo ai geni *APOA4/APOA1/APOA5* in un cluster di geni localizzato sul braccio lungo del cromosoma 11 (11q23). Il gene *APOC3* contiene elementi di regolazione che rispondono

negativamente all'insulina (down-regulation) e positivamente al glucosio (up-regulation). La trascrizione del gene è anche regolata dai fattori trascrizionali della famiglia dei PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptors).

Ad esempio molecole che inducono PPAR-alfa riducono l'espressione del gene *APOC3* (2).

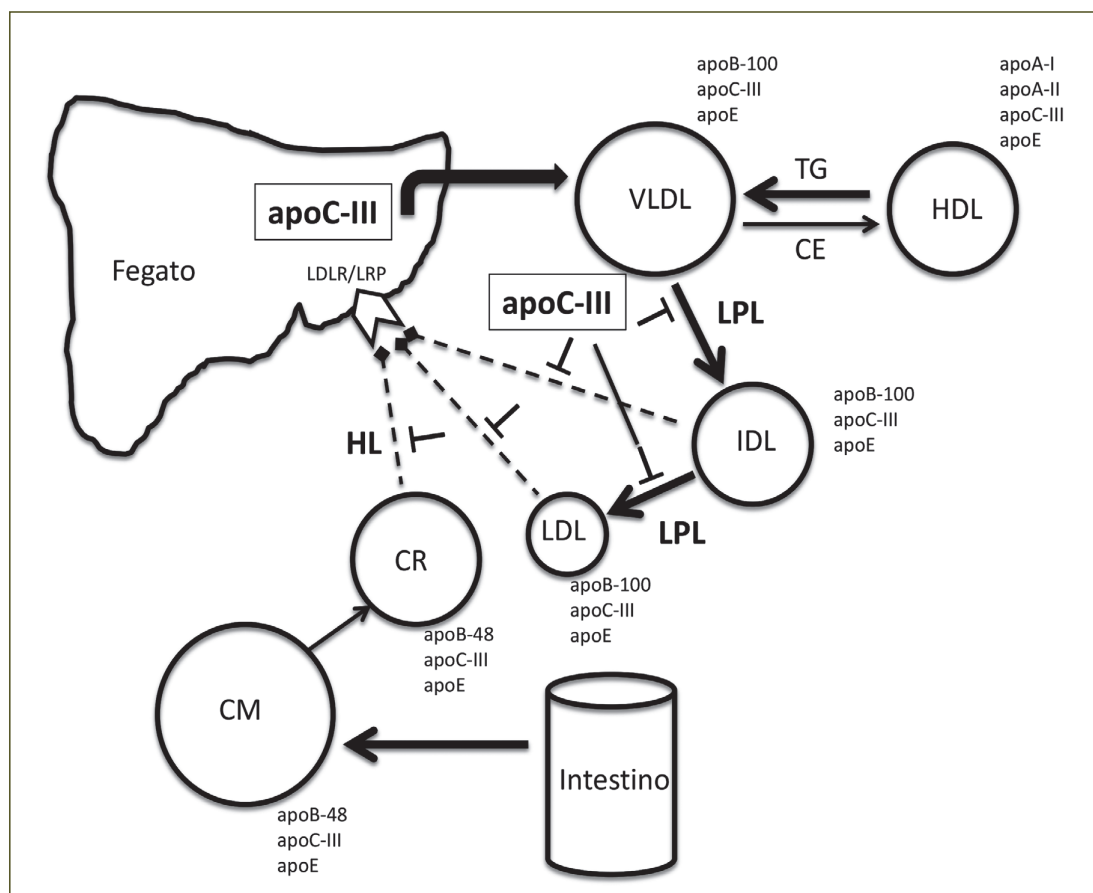
### Ruolo dell'apoC-III nel metabolismo lipoproteico

L'apoC-III esercita la sua funzione sia nel compartimento plasmatico che nel fegato. Nel compartimento plasmatico l'apoC-III agisce come inibitore della lipasi lipoproteica (3-5) attraverso due meccanismi:

- 1) spiazzando la apolipoproteina C-II (apoC-II) che è l'attivatore fisiologico della LPL;
- 2) dislocando le lipoproteine ricche in trigliceridi (TGR-Lp) (VLDL e Chilomicroni) dal legame con la LPL durante la cascata lipolitica intravascolare.

Le TGR-Lp infatti stabilizzano la LPL e la proteggono dall'intervento di fattori inattivanti come la angiopoietin like protein-4 (ANGPTL-4). La presenza di apoC-III rende meno stabile l'interazione delle TGR-Lp con la LPL e pertanto l'enzima risulta più suscettibile all'azione inattivante irreversibile di ANGPTL-4 (5). Vi sono indicazioni che l'apoC-III inibisca anche la lipasi epatica (HL) (2). Il risultato finale di questa inibizione è un rallentamento della cascata lipolitica intravascolare delle TGR-Lp, che si traduce in una più prolungata permanenza di queste lipoproteine nel compartimento plasmatico (*Figura 1*).

Nel fegato l'apoC-III esplica la sua funzione a due livelli. In primo luogo at-



**Figura 1** - Ruolo dell'apoC-III nel metabolismo delle lipoproteine. Nel fegato l'apoC-III promuove la lipidizzazione dell'apoB-100 nelle fasi tardive della formazione delle VLDL. Nel compartimento vascolare l'apoC-III inibisce l'attività dell'enzima Lipasi Lipoproteica (LPL). A livello della membrana plasmatica degli epatociti l'apoC-III riduce la cattura delle IDL e dei remnants dei chilomicroni (CR). Il risultato di queste molteplici azioni è l'accumulo nel plasma di lipoproteine ricche in trigliceridi.

tenua l'interazione delle TGR-Lp (particolarmente le VLDL ed i remnants di chilomicroni e di VLDL) con il Recettore LDL (LDLR) ed il recettore LRP1 (LDL Receptor Related Protein1) presenti sulla membrana plasmatica epatocitaria, probabilmente attraverso una competizione nei confronti della apolipoproteina E (apoE) e della apolipoproteina B-100 (ApoB-100), i ligandi fisiologici di questi recettori (6, 7) (Figura 1). Nei topi che sovra-esprimono l'apoC-III umana e che presentano ipertrigliceridemia si verifica

una diminuita rimozione delle VLDL dal plasma in relazione ad una diminuita concentrazione di apoE in queste lipoproteine a vantaggio dell'apoC-III (8).

Viceversa nei topi con deficienza di apoC-III (topi *ApoC3* Knock-Out) si osserva una ipotrigliceridemia dovuta ad un'aumentata rimozione di TGR-Lp sia a digiuno e nella fase post-prandiale (9, 10).

In secondo luogo l'apoC-III favorisce l'assemblaggio delle VLDL nell'epatocita, facilitando il reclutamento di lipidi nelle fasi tardive di formazione delle VLDL (le

fasi che seguono la prima lipidizzazione dell'apoB-100 mediata dalla proteina MTP) (11, 12). La sovra-espressione di apoC-III in topi transgenici (condizione che si associa ad una ipertrigliceridemia severa) aumenta la secrezione di VLDL mentre l'opposto si verifica nei topi nei quali è stato inattivato il gene *ApoC3* (12) (Figura 1).

Studi di cinetica nell'uomo hanno dimostrato uno stretto legame tra incremento della produzione epatica di VLDL-apoC-III e VLDL-TG. Inoltre in individui con elevato BMI e resistenza insulinica, si è osservata un'augmentata produzione epatica di VLDL apoC-III in stretta correlazione con i livelli plasmatici di trigliceridi. In pazienti con obesità centrale, gli elevati livelli plasmatici di VLDL-apoC-III sono la conseguenza di un'augmentata produzione di VLDL-apoC-III (13-15).

### **Livelli plasmatici di trigliceridi e di apoC-III e rischio cardiovascolare**

È noto da tempo che i livelli plasmatici dei trigliceridi sia in condizione post-prandiale sia in condizione di digiuno sono fattori di rischio cardiovascolare indipendente e sono associati ad incremento di malattia coronarica.

Inoltre la dislipidemia associata ad incremento dei livelli plasmatici di TGR-Lp è considerata causa primaria di aumento del rischio CVD nei pazienti con diabete di tipo 2 o con sindrome metabolica. Recenti studi epidemiologici e meta-analisi hanno riaffermato che elevati livelli di TG plasmatici sono associati a malattia coronarica (CHD) e rappresentano un rischio incrementale di ricorrenza di CHD in pazienti con CHD stabile (16-24).

Inoltre il rischio di CHD si riduce quando i livelli di trigliceridi sono ridotti

(20). Infine livelli elevati di trigliceridi in "condizione non fasting" aumentano il rischio di stroke (24). Valori estremamente elevati di trigliceridi (>1.000 mg/dl), quali si osservano tipicamente nella chilomicronemia familiare da deficit di LPL, non sembrano essere associati ad aumentato rischio cardiovascolare ma piuttosto ad aumentato rischio di pancreatite (25).

Elevati livelli plasmatici di apoC-III sono strettamente correlati alla presenza di ipertrigliceridemia sia nell'uomo che nei modelli animali.

Aumentati livelli di apoC-III nelle VLDL rappresentano un fattore predittivo di malattia coronarica anche in misura maggiore del livello dei trigliceridi. Anche i livelli di LDL che contengono apoC-III e che si formano durante la lipolisi parziale di VLDL contenenti apoC-III in eccesso, sono altamente predittivi di rischio cardio-vascolare (26-29).

### **ApoC-III ed infiammazione**

Nel tentativo di comprendere meglio un eventuale ruolo pro-aterogeno di elevati livelli di apoC-III, sono stati disegnati studi per verificare se l'apoC-III giocasse qualche ruolo nei complessi processi infiammatori che si svolgono nel corso della aterosclerosi.

Studi *in vitro* hanno documentato che l'apoC-III attiva i monociti aumentando l'espressione di  $\beta$ 1-integrine, molecole che svolgono un ruolo importante nel promuovere l'adesione dei monociti all'endotelio e quindi la loro migrazione attraverso l'endotelio stesso (30).

Inoltre apoC-III induce l'espressione di molecole di adesione sull'endotelio, che facilitano il reclutamento dei leucociti. Infine la somministrazione di apoC-III umana in topi ipercolesterolemici per difetto del LDLR (*ldlr*<sup>-/-</sup>), si associa ad aumento

dell'apoC-III nelle placche ateromasiche e ad un incremento della transmigrazione leucocitaria (31, 32).

### ApoC-III e diabete

Gli elevati livelli plasmatici di apoC-III riscontrati nei pazienti con diabete di tipo-1, ha indotto a verificare sperimentalmente la relazione fra apoC-III e diabete. Le  $\beta$  cellule esposte a siero di pazienti diabetici vanno in apoptosi, un effetto che è abrogato da un anticorpo anti-apoC-III (33, 34). Lo studio di ratti del ceppo BB (un modello per il diabete di tipo-1) ha dimostrato che il livello plasmatico di apoC-III era aumentato nei ratti pre-diabetici, e che questo incremento promuoveva la morte delle  $\beta$ -cellule. Infine il trattamento di ratti pre-diabetici con oligo-nucleotidi anti-senso nei confronti di apoC-III induceva un significativo ritardo nella comparsa del diabete (34, 35). Da queste osservazioni è emersa l'ipotesi che elevati livelli plasmatici di apoC-III rappresentino un fattore diabetogeno nell'uomo (36).

### Varianti genetiche rare di apoC-III

Importanti progressi nella comprensione del ruolo funzionale dell'apo C-III sono emersi dagli studi di varianti genetiche di questa proteina condotti sia su singoli individui/famiglie sia in campioni di popolazione di diverse etnie.

#### 1. Varianti genetiche rare di apoC-III identificate in singoli individui o famiglie

Alcune varianti genetiche rare (definite anche come "mutazioni") nel gene *APOC3*, associate a variazioni del profilo lipidico plasmatico, sono state riportate fin dagli anni '80 in alcuni individui o singole famiglie. Per esempio la sostituzione aminoacidica (Lys58Glu) riscontrata in

due individui appartenenti alla stessa famiglia, si associava ad una riduzione del 30-40% dei livelli plasmatici di apoC-III e ad elevati livelli di HDL-C (>95% percentile), senza effetti evidenti sui livelli di TG e LDL-C (37). Un'altra sostituzione aminoacidica (Ala23Thr) è stata descritta in due individui di una famiglia della popolazione Maya vivente nella penisola dello Yucatan.

Questi individui (portatori eterozigoti della mutazione) avevano livelli plasmatici di apoC-III molto più bassi rispetto ai loro familiari non portatori (38). Questi effetti sono stati attribuiti ad una ridotta capacità della apoC-III mutante di legare lipidi, un difetto che poteva indurre un accelerato catabolismo intracellulare (38). Studi funzionali condotti in vitro su cellule epatiche esprimenti i due mutanti Lys58Glu e Ala23Thr hanno dimostrato che queste due mutazioni riducono la capacità di apoC-III di promuovere la lipidizzazione dell'apoB-100 durante l'assemblaggio delle VLDL (39, 40) e quindi sono causa di ridotta secrezione di VLDL.

È opportuno segnalare che la mutazione Ala23Thr (oggi indicata come Ala43Thr secondo la nomenclatura corrente che si riferisce alla pre-proteina) è stata ritrovata in studi di popolazione in individui con ridotti livelli plasmatici di apoC-III e di TG (vedi oltre, studi di popolazione). Sono state riscontrate anche mutazioni di apoC-III (es. Thr74Ala) non associate a variazioni della concentrazione plasmatica della proteina o del profilo lipidico, ma alla esclusiva presenza nel plasma della isoforma apoC-III<sub>0</sub> (41). Viceversa nel caso della mutazione Gln38Lys, i portatori eterozigoti di questa mutazione presentavano livelli plasmatici di TG 30% più elevati rispetto ai familiari non portatori (42). Esistono quindi rare mutazioni di apoC-III che si traducono in

una perdita di funzione (mutazioni Loss of Function, LOF) o, più raramente, in un guadagno di funzione (mutazioni Gain of Function, GOF) che si associano a modificazioni del profilo lipidico plasmatico.

## 2. Varianti genetiche rare di apoC-III identificate in popolazioni

La ricerca sistematica di varianti rare del gene *APOC3* nelle popolazioni ha preso avvio dai risultati di uno studio di una popolazione “isolata”, qual è la popolazione “Old Order Amish” residente nella Contea di Lancaster in Pennsylvania (USA). In questa popolazione si è riscontrato che il 5% di individui era portatore eterozigote di una sostituzione di un singolo nucleotide nel gene *APOC3* che induceva la sostituzione dell’arginina in posizione 19 con un codone di stop (mutazione nonsense) (mutazione indicata come Arg19X o R19X) (43). Tale mutazione determina la formazione di una apoC-III troncata di soli 18 aminoacidi, verosimilmente degradata all’interno di epatociti ed enterociti prima di essere incorporata in VLDL e chilomicroni. Si tratta quindi di una classica mutazione con perdita di funzione (mutazione-LOF).

I portatori eterozigoti della mutazione presentavano ridotti livelli plasmatici di apoC-III (-50%), di TG sia a digiuno che dopo carico orale di lipidi (-46%), di LDL-C (-13%) e di non-HDL-C (-17%), così come un incremento dei livelli di HDL-C (+21%). Inoltre i portatori di mutazione avevano un “Calcium Score” coronarico molto più basso rispetto ai non portatori di pari età e sesso, suggerendo che il profilo lipidico plasmatico “favorevole”, presente fin dalla nascita, risultava protettivo nei confronti dello sviluppo di aterosclerosi coronarica (43). Studi ulteriori sono stati condotti per determinare la prevalenza di questa mutazione in

comunità “Amish” residenti in altre aree geografiche degli USA (Ohio ed Indiana), con esito negativo. Tuttavia la ricerca di questa mutazione nei 19.613 partecipanti al “National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III, 1999 to 2002) ha rivelato una frequenza di 0,08% (44). La presenza di R19X allo stato eterozigote si associava ad una consistente riduzione dei livelli plasmatici di TG, un incremento di HDL-C ed una modesta ma significativa riduzione dei livelli di LDL-C rispetto ai soggetti non portatori della mutazione (44).

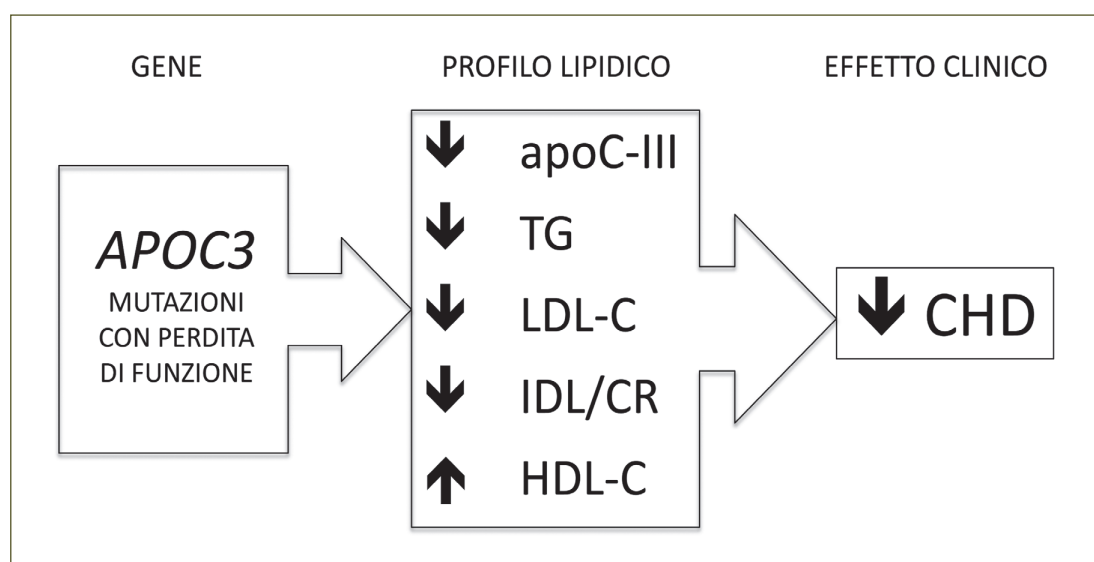
Due studi di randomizzazione Mendeliana pubblicati nel 2014 hanno rafforzato il concetto che mutazioni LOF di apoC-III sono associate ad un profilo lipidico più favorevole e ad un minore rischio cardio-vascolare. Nel primo studio, che coinvolgeva i partecipanti dell’Exome Sequencing Project (USA) coordinato dal Dr. S. Kathiresan, era finalizzato ad identificare rare varianti geniche nella sequenza codificante (esoma) del genoma umano (45). Ciò ha portato all’identificazione di quattro mutazioni LOF del gene *APOC3*, tre delle quali determinavano proteine troncate (come la Arg19X o R19X) (43, 44) o difetti di splicing del mRNA (come le mutazioni IVS2+ 1G>A e IVS3+ 1G>T) (con formazione di proteine anomale) ed una mutazione che determinava una sostituzione aminoacidica nella proteina (Ala43Thr) (A43T) (già nota come Ala23Thr, vedi sopra) (38). Si è osservato che un individuo su 150 era portatore eterozigote di qualcuna di queste mutazioni. La presenza di queste mutazioni (considerate insieme) si associava ad una riduzione dei livelli plasmatici di apoC-III (46%), di TG (39%) e di LDL-C (22%) ed un aumento dei livelli di HDL-C (22%). Estendendo la ricerca ad un campione di 115.000 individui si è osservato

che i portatori di qualcuna di queste varianti (498 individui) avevano una riduzione del rischio cardio-vascolare del 40% rispetto ai soggetti non portatori (110.472 individui). I risultati suggerivano che la perdita di funzione di apoC-III su base genetica (e quindi presente sin dalla nascita), conferisse protezione nei confronti degli eventi cardiovascolari, probabilmente in quanto una minore disponibilità di apoC-III facilitava l'azione della Lipasi Lipoproteica (LPL) e la cattura epatica recettore-mediata dei remnants dei chilomicroni e delle VLDL, che sono lipoproteine aterogene. Includendo nello studio genetico i partecipanti del Framingham Heart Study con un follow-up di 14 anni, è stato possibile calcolare che ad 1 mg di decremento dei livelli plasmatici di apoC-III corrispondeva una diminuzione del 4% del rischio cardiovascolare (45).

Nel secondo studio, che ha coinvolto più di 75.000 persone, sono state affrontate due domande:

- 1) se ridotti livelli di TG plasmatici (in condizioni "non fasting") fossero associati ad un minore rischio cardiovascolare;
- 2) se mutazioni con perdita di funzione di apoC-III fossero associate a ridotti livelli di TG plasmatici e conseguentemente a ridotto rischio cardio-vascolare (46).

Riguardo alla prima domanda si è osservato che gli individui con livelli di TG inferiori a 1 mmol/l (90 mg/dl) avevano un rischio cardiovascolare significativamente più basso rispetto agli individui con livelli di TG superiore a 4 mmol/l (350 mg/dl). Riguardo alla seconda domanda si è osservato che la condizione di portatore eterozigote di mutazioni LOF di apoC-III (R19X, IVS2+1G>A e A43T) (tre delle mutazioni riscontrate anche nello studio di Kathriesan et al.) (45) era associata ad una riduzione del 44% dei livelli plasmatici di TG. Parallelamente, nei



**Figura 2** - Effetto delle mutazioni con perdita di funzione (mutazioni LOF) del gene APOC3. Queste mutazioni hanno un effetto pleiotropico sul profilo lipidico plasmatico che si traduce in una riduzione del rischio di malattia coronarica (CHD).

portatori di queste mutazioni il rischio cumulativo per malattie cardio-vascolari e malattia ischemica del miocardio erano ridotti del 41% e 36% rispettivamente. In modo specifico il rischio cardiovascolare presentava un decremento graduale (“stepwise”) in relazione ai livelli plasmatici di TG. Un limite di questo studio è che i livelli di apoC-III non sono stati misurati. È opportuno segnalare che in questo studio i portatori di mutazioni LOF di apoC-III presentavano anche una modesta riduzione di livelli di LDL-C (5%) ed un incremento dei livelli di HDL-C (24%) attribuibile all'effetto pleiotropico del deficit di apoC-III (46). Entrambi gli studi di randomizzazione mendeliana erano concordi nell'ipotizzare che apoC-III potesse rappresentare un nuovo bersaglio terapeutico per il trattamento delle ipertrigliceridemie.

In un editoriale di commento a questi due studi, Hobbs e Cohen (47) hanno posto l'accento sul fatto che il deficit genetico di apoC-III mostrava un effetto pleiotropico sul profilo lipidico plasmatico influenzando tutte le classi di lipoproteine (*Figura 2*). In particolare essi hanno rimarcato il fatto che in entrambi gli studi, sia pure in misura diversa, i portatori di mutazioni LOF di apoC-III presentavano ridotti livelli di LDL-C.

A loro giudizio potrebbe essere proprio questa riduzione di LDL-C responsabile degli effetti benefici sul rischio cardiovascolare del deficit di apoC-III e non tanto la riduzione dei TG (trasportati dalle VLDL e/o dai remnants di VLDL e chilomicroni) o l'incremento delle HDL.

Secondo questi autori per dirimere questo dubbio sono necessari studi di randomizzazione mendeliana di varianti genetiche che abbiano un effetto selettivo sui livelli di TG senza ricadute sui livelli di LDL-C o di HDL-C. Ciò non toglie che

Hobbs e Cohen, ritengano l'apoC-III un possibile bersaglio terapeutico nel trattamento delle ipertrigliceridemie (47).

### L'apoC-III come bersaglio terapeutico

La serie di osservazioni su esposte hanno suggerito l'ipotesi che l'apoC-III fosse un promettente bersaglio terapeutico per il trattamento dell'ipertrigliceridemia, riproponendo una situazione simile a quanto è avvenuto per PCSK9 per il trattamento delle ipercolesterolemie primitive.

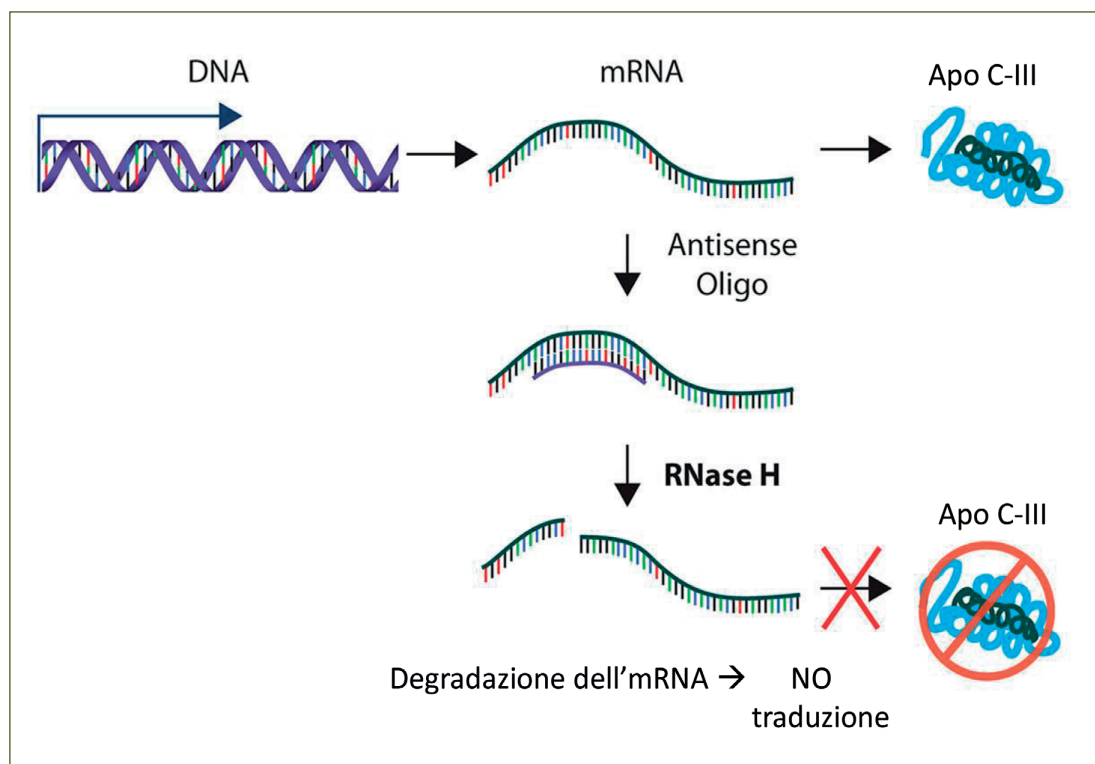
Nel caso di apoC-III tuttavia, l'idea di sviluppare un anticorpo monoclonale specifico, trovava un limite nella “relativamente” elevata concentrazione plasmatica di apoC-III (8-10 mg/dl nei soggetti normo-trigliceridemici e fino ad 30 mg/dl nelle condizioni di ipertrigliceridemia) rispetto ai livelli plasmatici di PCSK9 (5-30 µg/100 ml).

Da ciò l'idea di privilegiare lo sviluppo di una strategia basata sull'inibizione della produzione di apoC-III ottenuta per mezzo di oligonucleotidi sintetici antisense (ASO), che legandosi all'mRNA di apoC-III ne inibissero la traduzione e ne promuovessero il catabolismo intracellulare (*Figura 3*).

La “proof of principle” di questo approccio terapeutico, e la sua possibile estensione all'uomo, sono stati forniti da Graham et al. nel 2013 (48).

Questi autori hanno valutato l'efficacia di una serie di ASO specie-specifici in studi pre-clinici eseguiti in topi normali, in topi transgenici esprimenti apoC-III umana ed in topi con deficit di apoC-III, investigati in diverse condizioni sperimentali associate o meno a ipertrigliceridemia. Lo studio pre-clinico è stato poi esteso a primati non-umani.





**Figura 3** - Meccanismo di azione di un oligonucleotide antisense anti apolipoproteina C-III. Nella parte in alto è rappresentata la trascrizione del gene APOC3, e la traduzione del corrispondente mRNA con la formazione dell'apolipoproteina C-III. L'oligonucleotide antisense specifico è una breve sequenza nucleotidica a singolo filamento che si lega specificamente all'mRNA dell'apoC-III. Il prodotto che si forma, a doppio filamento, rende l'mRNA suscettibile alla degradazione da parte di RNasi. Pertanto la traduzione dell' mRNA non si verifica e non si forma quindi apolipoproteina C-III.

Questa ricerca preliminare ha dimostrato una buona tollerabilità ed una sostanziale efficacia degli ASO testati, che riducevano i livelli plasmatici di apoC-III e TG.

Ciò ha indotto a proseguire le indagini con uno studio di fase 1 in volontari sani nei quali si è ottenuta una sostanziale riduzione dei livelli plasmatici di apoC-III e una concomitante riduzione dei TG, senza segni di effetti avversi importanti attribuibili al farmaco (a parte una reazione transitoria nella sede di iniezione del farmaco).

Complessivamente questi studi hanno dimostrato che l'inibizione della produ-

zione di apoC-III porta ad una serie di effetti "benefici" sul profilo lipidico potenzialmente anti-aterogeni consistenti in:

- 1) una sostanziale riduzione dei livelli plasmatici di apoC-III e dei livelli dei TG sia in condizione di digiuno che in fase post-prandiale;
- 2) un'umentata rimozione dei TG plasmatici in fase post-prandiale;
- 3) una riduzione dei TG nelle VLDL;
- 4) la tendenza ad un aumento dei livelli di HDL.

Nei modelli animali la riduzione dei livelli plasmatici di apoC-III non era da ascriversi ad una riduzione della sintesi

di VLDL e chilomicroni, suggerendo che tale riduzione fosse il risultato di un'aumentata rimozione delle TGR-Lp dal compartimento plasmatico.

Da queste osservazioni ha preso l'avvio una sperimentazione di fase 2, che prevede il reclutamento di pazienti con livelli di trigliceridi >500 mg/dl in trattamento dietetico e farmacologico come da pratica clinica corrente (48).

Nel dicembre del 2014 è comparso il primo articolo riguardante l'efficacia del trattamento ASO in tre pazienti con una ipertrigliceridemia severa dovuta a deficit genetico completo di LPL (chilomicronemia familiare) (49).

In linea di principio tali pazienti non sembravano "ideali" per testare un farmaco contro l'apoC-III, poiché la causa riconosciuta della ipertrigliceridemia era un grave deficit genetico di LPL che non si riteneva a priori possibile correggere riducendo i livelli plasmatici di apoC-III (inibitore della LPL).

Tuttavia, tenendo conto degli altri effetti metabolici dell'apoC-III (sull'assemblaggio/secrezione di VLDL e sulla rimozione epatica di TGR-Lp) (*Figura 1*), era ragionevole assumere che la riduzione dei livelli di apoC-III potesse attenuare la ipertrigliceridemia. L'oligonucleotide antisense (ISIS304801) è stato somministrato in tre pazienti con livelli di trigliceridi compresi fra 1.406 e 2.083 mg/dl.

Dopo 13 settimane di trattamento i livelli di apoCIII presentavano una riduzione del 71%-90% ed i livelli dei TG del 56-86%. Durante il periodo di trattamento i livelli di TG sono rimasti al di sotto di 500 mg/dl.

Questo risultato non era dovuto ad incremento di attività di LPL (i cui valori sono rimasti invariati a seguito del trattamento e comunque sempre inferiori al 3% dei valori controllo) ma probabilmente

ad una ridotta secrezione di VLDL/chilomicroni e/o ad un'aumentata rimozione di TGR-Lp da parte del fegato (attraverso un processo di rimozione LPL indipendente).

Queste osservazioni suggeriscono che un trattamento con ASO se ben tollerato, riducendo i livelli dei TG plasmatici, potrebbe ridurre considerevolmente il rischio di pancreatite nei pazienti con chilomicronemia familiare e, a maggior ragione, il rischio cardiovascolare nei pazienti con altre forme di ipertrigliceridemia di grado moderato.

## Conclusioni

La storia dell'apoC-III, iniziata più di 40 anni e che appariva conclusa, sembra ora proiettarsi nel futuro. In questo scenario l'apoC-III appare come una molecola regolatrice che svolge un ruolo centrale e pleiotropico sul metabolismo delle lipoproteine.

In condizioni fisiologiche l'apoC-III contribuirebbe a rallentare la lipolisi intravascolare delle TGR-Lp, riducendo l'attività della LPL e la rimozione dei remnants delle VLDL e dei chilomicroni. Nel fegato la disponibilità di apoC-III favorirebbe la formazione di VLDL evitando l'accumulo di lipidi (steatosi) responsabile di danno cellulare e possibili risposte infiammatorie.

L'apoC-III potrebbe anche costituire una delle molecole coinvolte nella immunità innata e nei processi difensivi. Condizioni che inducono l'aumento della produzione di apoC-III (es. insulino-resistenza) si associano ad un aumento del livello di TGR-Lp con possibile incremento del rischio cardiovascolare (nelle ipertrigliceridemie di media gravità) o il rischio di pancreatite nei casi di ipertrigliceridemie severe (chilomicronemia

familiare). L'osservazione che individui portatori di mutazioni LOF di apoC-III hanno un profilo lipidico "favorevole" ed un minore rischio di CHD, ha indotto ad ipotizzare trattamenti farmacologici che abbiano l'apoC-III come bersaglio terapeutico primario.

L'impiego di Oligonucleotidi Antisense (ASO) anti apoC-III in modelli pre-clinici ed in studi di Fase 1 e Fase 2 nell'uomo si è dimostrato efficace nel ridurre i livelli plasmatici di apoC-III e TG senza importanti eventi avversi, almeno nel breve periodo di trattamento.

Ovviamente rimangono problemi aperti dei possibili effetti a lungo termine di questo trattamento con ASO, anche alla

luce dell'esperienza del Mipomersen (l'ASO anti apoB-100) proposto per il trattamento delle forme gravi di ipercolesterolemia familiare.

Anche per l'ASO anti apoC-III si pone il problema del possibile accumulo di lipidi nel fegato dovuto ad una possibile riduzione della secrezione di VLDL o comunque di un minore carico di lipidi incorporati nelle VLDL.

Infine rimane da dimostrare se il trattamento a lungo termine riduca il rischio cardiovascolare correlato ad una moderata ipertrigliceridemia e il rischio di pancreatite nelle forme di ipertrigliceridemia severa quale quella che si riscontra nei deficit genetici della LPL (50).

#### RIASSUNTO

L'apolipoproteina C-III (apoC-III) fu identificata come componente proteico delle lipoproteine ricche in trigliceridi (TGR-Lp) più di 40 anni or sono. Una delle prime funzioni ad essa attribuita fu la capacità di esercitare un'inibizione non competitiva nei confronti della Lipasi Lipoproteica (LPL). Successivamente fu dimostrato che l'apoC-III riduceva la rimozione dal plasma delle TGR-Lp, competendo con l'apolipoproteina E (apoE) per l'interazione con recettori specifici (LDLR e LRP1) a livello della membrana plasmatica degli epatociti.

Numerosi studi epidemiologici, che hanno rivelato un'associazione indipendente tra livelli di trigliceridi e rischio cardio-vascolare, hanno anche documentato una stretta associazione tra livelli plasmatici di trigliceridi e livelli di apoC-III, che è divenuta di "per sé" un marcatore di rischio cardio-vascolare.

Recenti studi di genetica hanno documentato che i portatori di mutazioni del gene APOC3 che inducono la perdita di funzione della proteina (mutazioni LOF) hanno più bassi livelli plasmatici di apoC-III, di trigliceridi e di LDL-C e più elevati livelli di HDL-C rispetto ai non portatori. A questo profilo dei lipidi plasmatici corrisponde una sostanziale riduzione del rischio cardio-vascolare.

Queste osservazioni hanno suggerito che l'apoC-III potesse rappresentare un bersaglio terapeutico per il trattamento delle ipertrigliceridemie. In questa prospettiva sono stati sviluppati oligonucleotidi antisense (ASO) contro l'apoC-III che, testati in modelli animali, hanno fornito incoraggianti risultati sia in termini di riduzione dei livelli plasmatici di trigliceridi e di apoC-III sia in termini di sicurezza.

Lo studio di fase 1 nell'uomo ha dato risultati positivi che hanno consentito l'avvio di studi di fase 2. Il trattamento con ASO anti apoC-III di tre pazienti con ipertrigliceridemia severa dovuta a deficit genetico di LPL (Chilomicronemia Familiare) ha dimostrato che questo farmaco, almeno in esperimenti di trattamento a breve termine, è efficace nel determinare una sostanziale riduzione dei livelli di trigliceridi senza indurre effetti avversi importanti.

Pertanto tale farmaco potrebbe essere impiegato nel trattamento della chilomicronemia familiare per ridurre il rischio di pancreatite connesso alla ipertrigliceridemia estrema, così come nel trattamento delle forme di ipertrigliceridemia moderata per ridurre il rischio cardio-vascolare.

**Parole chiave:** *apolipoproteina C-III; ipertrigliceridemia; lipasi lipoproteica; gene APOC3; randomizzazione mendeliana; oligonucleotidi anti-senso.*

## Bibliografia

- Jong MC, Hofker MH, Havekes LM. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 472-484.
- Chan DC, Chen MM, Ooi EM, Watts GF. An ABC of apolipoprotein C-III: a clinically useful new cardiovascular risk factor? *Int J Clin Pract.* 2008; 62: 799-809.
- Wang CS, McConathy WJ, Kloer HU, Alaupovic P. Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. *J Clin Invest.* 1985; 75: 384-390.
- McConathy WJ, Gesquiere JC, Bass H, Tartar A, Fruchart JC, Wang CS. Inhibition of lipoprotein lipase activity by synthetic peptides of apolipoprotein C-III. *J Lipid Res.* 1992; 33: 995-1003.
- Larsson M, Vorrnsjö E, Talmud P, Lookene A, Olivecrona G. Apolipoproteins C-I and C-III inhibit lipoprotein lipase activity by displacement of the enzyme from lipid droplets. *J Biol Chem.* 2013; 288: 33997-4008.
- Windler E, Havel R. Inhibitory effects of C apolipoproteins from rats and humans on the uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants by the perfused rat liver. *J Lipid Res.* 1985; 26: 556-565.
- Sehayek E, Eisenberg S. Mechanisms of inhibition by apolipoprotein C of apolipoprotein E-dependent cellular metabolism of human triglyceride-rich lipoproteins through the low density lipoprotein receptor pathway. *J Biol Chem.* 1991; 266: 18259-18267.
- Aalto-Setälä K, Fisher EA, Chen X, et al. Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles. *J Clin Invest.* 1992; 90: 1889-1900.
- Maeda N, Li H, Lee D, Oliver P, Quarfordt SH, Osada J. Targeted disruption of the apolipoprotein C-III gene in mice results in hypotriglyceridemia and protection from postprandial hypertriglyceridemia. *J Biol Chem.* 1994; 269: 23610-23616.
- Bjong MC, Rensen PC, Dahlmans VE, van de Boom H, van Barkel TJ, Havekes LM. Apolipoprotein C-III deficiency accelerates triglyceride hydrolysis by lipoprotein lipase in wild-type and apoE knockout mice. *J Lipid Res* 2001; 42:1578-1585.
- Sundaram M, Zhong S, Bou Khalil M, et al. Expression of apolipoprotein C-III in McA-RH7777 cells enhances VLDL assembly and secretion under lipid-rich conditions. *J Lipid Res.* 2010; 51: 150-161.
- Yao Z, Wang Y. Apolipoprotein C-III and hepatic triglyceride-rich lipoprotein production. *Curr Opin Lipidol.* 2012; 23: 206-212.
- Cohn JS, Patterson BW, Uffelman KD, Davignon J, Steiner G. Rate of production of plasma and very-low-density lipoprotein (VLDL) apolipoprotein C-III is strongly related to the concentration and level of production of VLDL triglyceride in male subjects with different body weights and levels of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 3949-3955.
- Zheng C, Khoo C, Furtado J, Sacks FM. Apolipoprotein C-III and the metabolic basis for hypertriglyceridemia and the dense low-density lipoprotein phenotype. *Circulation* 2012; 121: 1722-1734.
- Chan DC, Nguyen MN, Watts GF, Barrett PH. Plasma apolipoprotein C-III transport in centrally obese men: associations with very low-density lipoprotein apolipoprotein B and high-density lipoprotein apolipoprotein A-I metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93: 557-564.
- Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, et al. National Heart, Lung, and Blood Institute; American College of Cardiology Foundation; American Heart Association. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation.* 2004; 110: 227-239.
- Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, et al. American Heart Association Clinical Lipidology, Thrombosis, and Prevention Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism; Council on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology; Council on Cardiovascular Nursing; Council on the Kidney in Cardiovascular Disease. Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2011; 123: 2292-2333.
- Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, et al. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation* 2007; 115: 450-458.
- Tirosh A, Rudich A, Shochat T, et al. Changes in triglyceride levels and risk for coronary heart disease in young men. *Ann Intern Med.* 2007; 147: 377-385.
- Faergeman O, Holme I, Fayyad R, et al. Steering Committees of IDEAL and TNT Trials. Plasma triglycerides and cardiovascular events in the Treating to New Targets and Incremental Decrease in End-Points through Aggressive

- Lipid Lowering trials of statins in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2009; 104: 459-463.
21. Kolovou GD, Mikhailidis DP, Kovar J, et al. Assessment and clinical relevance of non-fasting and postprandial triglycerides: an expert panel statement. *Curr Vasc Pharmacol.* 2011; 9: 258-270.
  22. Di Angelantonio E, Sarwar N, Perry P, et al. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA.* 2009; 302: 1993-2000.
  23. Chapman MJ, Ginsberg HN, Amarenco P, et al. European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Triglyceride-rich lipoproteins and high density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *Eur Heart J.* 2011; 32: 1345-1361.
  24. Freiberg JJ, Tybjaerg-Hansen A, Jensen JS, Nordestgaard BG. Nonfasting triglycerides and risk of ischemic stroke in the general population. *JAMA.* 2008; 300: 2142-2152.
  25. Brahm AJ, Hegele RA. Chylomicronaemia-current diagnosis and future therapies. *Nat Rev Endocrinol.* 2015 Mar 3. doi: 10.1038/nrendo.2015.26. (in corso di stampa).
  26. Sacks FM, Alaupovic P, Moye LA, et al. VLDL, apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial. *Circulation.* 2000; 102: 1886-1892.
  27. Zheng C, Khoo C, Furtado J, Sacks FM. Apolipoprotein C-III and the metabolic basis for hypertriglyceridemia and the dense low-density lipoprotein phenotype. *Circulation.* 2010; 121: 1722-1734.
  28. Lee SJ, Campos H, Moye LA, Sacks FM. LDL containing apolipoprotein CIII is an independent risk factor for coronary events in diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 853-858.
  29. Mendivil CO, Rimm EB, Furtado J, Chiuve SE, Sacks FM. Low-density lipoproteins containing apolipoprotein C-III and the risk of coronary heart disease. *Circulation.* 2011; 124: 2065-2072.
  30. Kawakami A, Aikawa M, Alcaide P, Lusinskas FW, Libby P, Sacks FM. Apolipoprotein CIII induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vascular endothelial cells and increases adhesion of monocytic cells. *Circulation.* 2006; 114: 681-687.
  31. Kawakami A, Aikawa M, Libby P, Alcaide P, Lusinskas FW, Sacks FM. Apolipoprotein CIII in apolipoprotein B lipoproteins enhances the adhesion of human monocytic cells to endothelial cells. *Circulation.* 2006; 113: 691-700.
  32. Zheng C, Azcutia V, Aikawa E, et al. Statins suppress apolipoprotein CIII induced vascular endothelial cell activation and monocyte adhesion. *Eur Heart J.* 2013; 34: 615-624.
  33. Juntti-Berggren L, Larsson O, Rorsman P, et al. Increased activity of L-type Ca<sup>2+</sup> channels exposed to serum from patients with type I diabetes. *Science.* 1993; 261: 86-90.
  34. Juntti-Berggren L, Refai E, Appelskog I, et al. Apolipoprotein CIII promotes Ca<sup>2+</sup>-dependent beta cell death in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 2004; 101: 10090-10094.
  35. Tirosch A, Rudich A, Shochat T, et al. Lowering apolipoprotein CIII delays onset of type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 2011; 108: 10685-10689.
  36. Åvall K, Ali Y, Leibiger IB, et al. Apolipoprotein CIII links islet insulin resistance to  $\beta$ -cell failure in diabetes *Proc Natl Acad Sci (USA).* 2015. pii: 201423849. (in corso di stampa).
  37. von Eckardstein A, Holz H, Sandkamp M, Weng W, Funke H, Assmann G. Apolipoprotein C-III (Lys58Glu). Identification of an apolipoprotein C-III variant in a family with hyperalphalipoproteinemia. *J Clin Invest.* 1991; 87: 1724-1731.
  38. Liu H, Labeur C, Xu CF, et al. Characterization of the lipid-binding properties and lipoprotein lipase inhibition of a novel apolipoprotein C-III variant Ala23Thr. *J Lipid Res.* 2000; 41: 1760-1771.
  39. Sundaram M, Zhong S, Bou Khalil M, et al. Functional analysis of the missense APOC3 mutation Ala23Thr associated with human hypotriglyceridemia. *J Lipid Res.* 2010; 51: 1524-1534.
  40. Qin W, Sundaram M, Wang Y, et al. Missense mutation in APOC3 within the C-terminal lipid binding domain of human ApoC-III results in impaired assembly and secretion of triacylglycerol-rich very low density lipoproteins: evidence that ApoC-III plays a major role in the formation of lipid precursors within the microsomal lumen. *J Biol Chem.* 2011; 286: 27769-27780.
  41. Maeda H, Hashimoto RK, Ogura T, Hiraga S, Uzawa H. Molecular cloning of a human apoC-III variant: Thr74Ala mutation prevents O-glycosylation. *J Lipid Res.* 1987; 28: 1405-1409.
  42. Pullinger CR, Malloy MJ, Shahidi AK, et al. A novel apolipoprotein C-III variant, apoC-III (Gln-38Lys), associated with moderate hypertriglyceridemia in a large kindred of Mexican origin. *J Lipid Res.* 1997; 38: 1833-1840.
  43. Pollin TI, Damcott CM, Shen H et al. A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection. *Science.* 2008; 322: 1702-1705.
  44. Crawford DC, Dumitrescu L, Goodloe R, et al. Rare variant APOC3 R19X is associated with cardio-protective profiles in a diverse population-based survey as part of the Epidemiologic

- Architecture for Genes Linked to Environment Study. *Circ Cardiovasc Genet.* 2014; 7: 848-853.
45. TG and HDL Working Group of the Exome Sequencing Project, National Heart, Lung, and Blood Institute, Crosby J, Peloso GM, Auer PL, Crosslin DR et al. Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease. *N Engl J Med.* 2014; 371: 22-31.
  46. Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Loss-of-function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease. *N Engl J Med.* 2014; 371: 32-41.
  47. Cohen JC, Stender S, Hobbs HH. APOC3, coronary disease, and complexities of Mendelian randomization. *Cell Metab.* 2014; 20: 387-389.
  48. Graham MJ, Lee RG, Bell TA 3rd, et al. Antisense oligonucleotide inhibition of apolipoprotein C-III reduces plasma triglycerides in rodents, nonhuman primates, and humans. *Circ Res.* 2013; 112: 1479-1490.
  49. Gaudet D, Brisson D, Tremblay K, et al. Targeting APOC3 in the familial chylomicronemia syndrome. *N Engl J Med.* 2014; 371: 2200-2206.
  50. Huff MW, Hegele RA. Apolipoprotein C-III: going back to the future for a lipid drug target. *Circ Res.* 2013; 112: 1405-1408.