

TERAPIA**STRATEGIE DI SILENZIAMENTO
GENICO NEL TRATTAMENTO
DELLE DISLIPIDEMIE****Gene silencing strategies in the treatment
of dyslipidemias****ANGELA PIRILLO^{1,2}, ALBERICO LUIGI CATAPANO^{2,3}, GIUSEPPE DANILO NORATA^{1,3}**¹Centro per lo Studio dell'Aterosclerosi, Ospedale E. Bassini, Cinisello Balsamo, Milano;²IRCCS MultiMedica, Milano;³Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari,
Università degli Studi di Milano**SUMMARY**

Despite progress in the management of dyslipidaemias, there is still need of new pharmacological approaches able to correct alterations in lipid/lipoprotein metabolism to reduce the residual cardiovascular risk, which persists also in optimally treated patients. In the recent years, the physiological mechanism of gene silencing, a post-transcriptional process by which cells regulate gene expression by turning off a selected gene, has been translated into selective pharmacological targeting and both antisense oligonucleotides (ASO) and small interfering RNA (siRNA) technologies have been developed with the aim to control the expression of specific genes playing key roles in lipid metabolism. Several antisense oligonucleotides have been developed to target apolipoprotein B, the main structural protein of VLDL, LDL and chylomicrons, apolipoprotein CIII or angiopoietin-like 3, both playing a role in regulating triglyceride levels, or apolipoprotein(a), to reduce lipoprotein (a) levels. A siRNA approach targeting PCSK9, a key modulator of LDL receptor trafficking which impacts plasma LDL-cholesterol levels, is also under clinical development. These gene-silencing approaches are highly specific and may be used with improved dose regimen as compared with conventional lipid-lowering therapies and might help in limiting their side effects. To date, clinical trials have demonstrated the efficacy of these therapies, but follow-up studies are warranted to demonstrate a benefit on cardiovascular outcome in parallel, to confirm their long-term safety and exclude off-target effects.

Keywords: *Gene silencing; antisense oligonucleotide; siRNA; dyslipidemia; cardiovascular disease.*

Introduzione

Le dislipidemie rappresentano uno dei principali fattori di rischio per le malattie cardiovascolari; nonostante l'introduzione di nuovi farmaci (quali gli anticorpi monoclonali contro PCSK9) e l'ottimizza-

Indirizzo per la corrispondenza

Prof. Giuseppe Danilo Norata
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e
Biomolecolari, Università degli Studi di Milano
Via Balzaretti, 9 - 20133 Milano
e-mail: danilo.norata@unimi.it

zione delle terapie, permane nei pazienti trattati un rischio cardiovascolare residuo spesso dipendente da infiammazione e/o ipertrigliceridemia. Anche pazienti con ipercolesterolemia familiare geneticamente determinata (*Familial hypercholesterolemia*, FH), caratterizzata da livelli elevati di colesterolo LDL (LDL-C) sin dalla nascita e da comparsa di malattia cardiovascolare precoce se non trattata adeguatamente, presentano un rilevante rischio cardiovascolare residuo nonostante l'ottimizzazione della terapia.

Negli ultimi anni, anche nell'ambito del trattamento delle dislipidemie, c'è stato un forte sviluppo dell'approccio basato sul silenziamento genico, ovvero sulla possibilità di usare oligonucleotidi antisenso a singolo filamento o sequenze corte di RNA a doppio filamento per "spegnere" in modo specifico l'espressione di un gene. Il vantaggio di questo approccio consiste nel fatto che le molecole agiscono all'interno della cellula, prevenendo la traduzione dell'mRNA nella proteina corrispondente, mentre altri tipi di approcci (quali gli anticorpi monoclonali) possono agire solo sulla proteina circolante. La riduzione dei livelli di proteine dannose attraverso RNA interferenza è applicabile a tutti i bersagli molecolari, inclusi quelli che sono difficilmente attaccabili con i tradizionali approcci farmacologici a base di piccole molecole o proteine. Questo ha portato allo sviluppo di diversi farmaci biologici per il controllo delle dislipidemie. Obiettivo di questa rassegna è presentare e discutere i dati recenti ottenuti con l'approccio del silenziamento genico in ambito cardiovascolare.

Il silenziamento genico

Il silenziamento genico è un processo post-trascrizionale di controllo dell'espressione genica che sfrutta la capacità di una

sequenza oligonucleotidica "antisenso" di ibridizzarsi con uno specifico mRNA target ("senso"), rendendolo non accessibile per la traduzione nella proteina corrispondente e determinando la sua degradazione da parte di specifiche nucleasi. Attualmente esistono due strategie di silenziamento genico che sono state sviluppate a fini farmacologici: gli oligonucleotidi antisenso (ASO) e gli *small interfering RNA* (siRNA) (Figura 1).

Gli oligonucleotidi antisenso, o ASO, sono brevi sequenze nucleotidiche a singolo filamento di DNA (o RNA) disegnate per legarsi in modo specifico a un mRNA e inibire la sintesi della proteina corrispondente. Gli ASO tal quali hanno una bassa affinità per l'mRNA bersaglio; per questo motivo sono state introdotte modificazioni chimiche dei nucleotidi (introduzione di gruppi alchilici -2'-*O*-metile o 2'-*O*-metossietile- nella posizione 2' dello zucchero) che aumentano l'affinità per la sequenza complementare, permettendo così di ridurre i dosaggi (1). Inoltre, gli ASO sono soggetti a rapida degradazione da parte delle nucleasi; sono quindi state introdotte una serie di modificazioni chimiche della molecola inserendo oligonucleotidi fosforotioati, in cui un atomo di ossigeno non coinvolto nei legami è sostituito con un atomo di zolfo: questo determina una maggiore stabilità, una maggiore resistenza all'attività delle nucleasi e un'emivita più lunga (1). La somministrazione di ASO può indurre tossicità; questa può derivare sia da un eccessivo effetto farmacologico, sia dalla possibilità che l'ASO leghi un mRNA diverso da quello target; inoltre l'ASO può accumularsi, o indurre una risposta pro-infiammatoria oppure ancora legarsi a proteine cellulari, o infine dare tossicità epatica o renale (2). Un altro effetto osservato con la somministrazione di ASO è la comparsa di

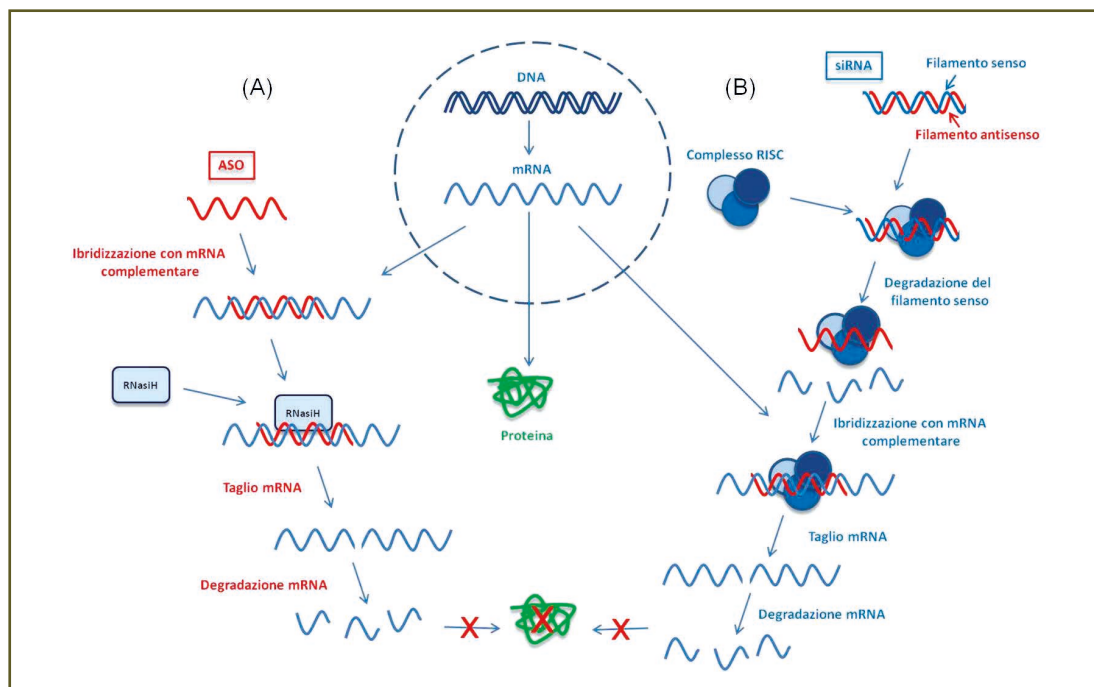


Figura 1 - Meccanismo d'azione di ASO e siRNA. (A) L'oligonucleotide antisense (ASO) si lega alla sequenza complementare di uno specifico mRNA, determinando il taglio enzimatico (mediato da RNasi H) dell'mRNA stesso e la sua successiva degradazione. (B) il siRNA a doppio filamento si associa al complesso enzimatico RISC; il filamento senso viene degradato, mentre quello antisense può ibridizzarsi all'mRNA complementare, che viene tagliato ad opera di una nucleasi e successivamente degradato ad opera di ribonucleasi.

trombocitopenia (2), che in alcuni studi ha interessato dal 20% al 60% dei pazienti trattati, portando all'interruzione del trattamento stesso.

Questo effetto collaterale sembra indipendente dalla sequenza 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.

Il processo di interferenza dell'RNA (RNA interference, RNAi) è un meccanismo di silenziamento genico post-trascrizionale comune a tutti gli organismi e altamente conservato, basato sulla capacità di frammenti di RNA a doppio filamento non codificanti (*double stranded RNA*, dsRNA) di prevenire l'espressione di uno specifico

gene attraverso l'appaiamento con mRNA bersaglio, seguito dalla sua degradazione. Questo avviene fisiologicamente attraverso un complesso processo che coinvolge più componenti. Inizialmente una lunga molecola di RNA a doppio filamento viene tagliata in un RNA a doppio filamento più corto contenente 20-25 nucleotidi (siRNA) che viene incorporato in un complesso enzimatico (*RNA-induced silencing complex*, RISC) e ridotto a singolo filamento: il filamento antisense (quello attivo) rimane legato al complesso, mentre il filamento senso viene degradato. In presenza di un mRNA complementare, avviene l'ibridizzazione al filamento antisense, seguita dall'attivazione di un enzima presente nel complesso RISC che opera un taglio sull'mRNA e dalla degradazione dei due

frammenti così generati. Il risultato finale è l'inibizione dell'espressione di uno specifico gene (Figura 1). Il filamento antisenso di RNA rimane protetto dal complesso RISC a lungo, creando una condizione per cui può silenziare l'espressione genica anche in un momento successivo. La scoperta di questo meccanismo ha permesso a C. Mello e A. Fire (3) di vincere il premio Nobel per la Medicina nel 2006. Questo processo fisiologico è subito diventato oggetto di intensi studi per sviluppare approcci farmacologici in grado di bersagliare geni specifici. Un vantaggio dell'RNAi è che non modifica direttamente il DNA, e quindi pone meno problemi sia dal punto di vista della sicurezza che dal punto di vista etico.

Anche la struttura dei siRNA viene ottimizzata attraverso modificazione con 2'-O-metile nel filamento antisenso, aumento della stabilità (fosforotioati per inibire l'attività delle nucleasi) e coniugazione con residui di carboidrati (N-acetilgalattosamina trivalente, GalNAc) per migliorare il tropismo epatico. Nell'ultimo caso infatti, il complesso GalNAc viene riconosciuto da un recettore specifico a livello epatico (ASGPR o recettore per le asialoglicoproteine), portando alla ve-

colazione del siRNA nel fegato. Grazie a queste modificazioni, i siRNA hanno un'elevata stabilità, sono resistenti all'azione delle nucleasi e hanno una farmacocinetica migliore rispetto ai siRNA non coniugati. Il risultato farmacologico è un robusto e duraturo silenziamento dell'mRNA target nel fegato.

Terapie ipocolesterolemizzanti basate sul silenziamento genico

Nel panorama dei numerosi farmaci per il controllo dell'ipercolesterolemia (4), occupano uno spazio sempre più im-

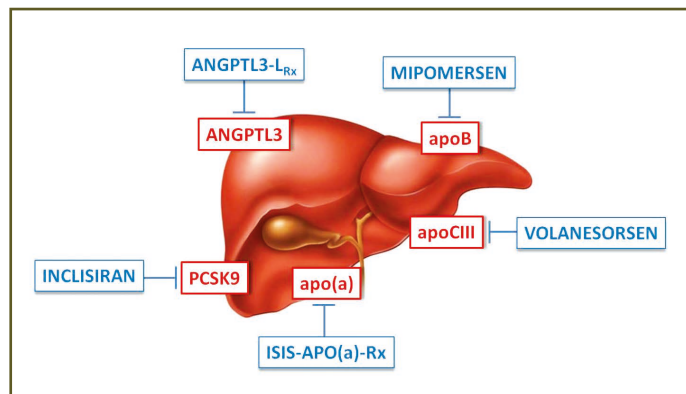


Figura 2 - Target epatici e approcci farmacologici basati sul silenziamento genico per il trattamento delle dislipidemie.

Tabella 1 - Approcci farmacologici basati sul silenziamento genico nell'ambito delle dislipidemie.

ASO o siRNA	Target	Riduzione % del target	Riduzioni %	Fase di sviluppo
Mipomersen	Apolipoproteina B	19%-54%	LDL-C: 13%-34%	Approvato
Inclisiran	PCSK9	32%-74,5%	LDL-C: Singola dose: 27,9%-41,9% Doppia dose: 35,5%-52,6%	FASE III
Volanesorsen	Apolipoproteina CIII	19,7%-90%	HTG TG: Monoterapia: 31,3%-71% Combinazione con fibrati: 51%-64% FCS TG: 56%-80%	FASE III
ANGPTL3-Rx	ANGPTL3	46,6%-84,5%	TG: 33,2%-63,1%	FASE II
ISIS-APO(a)-Rx	Apolipoproteina(a)	-	Lp(a): 26,2%-92%	FASE II

Abbreviazioni: HTG: ipertrigliceridemia; FCS: familial chylomicron syndrome.

portante i farmaci biologici, che includono gli anticorpi monoclonali anti-PCSK9 (5) e i farmaci basati sul silenziamento genico quali gli inibitori dell'apolipoproteina B (mipomersen) (6) o di PCSK9 (inclisiran) (7) (Figura 2, Tabella 1).

Mipomersen

L'apolipoproteina B è la principale apoproteina presente in LDL, VLDL, chilomicroni e Lp(a) ed è fondamentale per l'assemblaggio di queste lipoproteine a livello epatico ed intestinale. Elevati livelli plasmatici di apoB rappresentano un fattore di rischio cardiovascolare (8), suggerendo che la sua inibizione possa rappresentare un possibile target farmacologico per il trattamento dell'ipercolesterolemia. A questo scopo è stato sviluppato mipomersen, un oligonucleotide antisense di seconda generazione, che lega l'mRNA che codifica per apoB, inibendo la sintesi di apoB e, come conseguenza, di tutte le lipoproteine pro-aterogene contenenti apoB. Dato che il meccanismo di riduzione dei livelli di LDL-C è indipendente dal recettore LDL (LDLR) (9), il farmaco è efficace anche nei pazienti con FH che presentano mutazioni sul gene che codifica per LDLR associate ad una mancanza totale o ad una riduzione importante dell'attività di questo recettore. Mipomersen è stato approvato negli Stati Uniti per il trattamento dell'ipercolesterolemia familiare omozigote, mentre gli importanti effetti collaterali hanno portato l'EMA a non concedere l'autorizzazione in Europa. Mipomersen riduce significativamente i livelli di colesterolo sia in monoterapia che quando somministrato in combinazione con altri farmaci ipolipemizzanti, sia in pazienti con ipercolesterolemia familiare omozigote (HoFH) che eterozigote (HeFH) (10-12). Il farmaco è caratterizzato da una rapida distribuzio-

ne ai tessuti e ha un'emivita di circa 30 giorni; la concentrazione all'equilibrio viene raggiunta dopo circa 4-6 mesi di somministrazione settimanale. Poiché non viene metabolizzato dal sistema del citocromo P450 e non inibisce questi enzimi, mipomersen non mostra interazioni farmacocinetiche clinicamente rilevanti con altri farmaci ipolipemizzanti che potrebbero essere somministrati in concomitanza a questi pazienti, quali statine o ezetimibe (13).

Nei soggetti HoFH, mipomersen riduce i livelli di LDL-C fino al 21% ($p=0,0003$) e di Lp(a) fino al 23% ($p=0,0013$) (12). Il trattamento di pazienti HeFH già in terapia con farmaci ipolipemizzanti convenzionali riduce ulteriormente sia i livelli di LDL-C (fino a -37%, $p<0,001$) che di Lp(a) (fino a -29%, $p<0,05$) (10). Questa ulteriore diminuzione è da attribuirsi al diverso meccanismo d'azione di mipomersen. Anche soggetti HeFH con malattia cardiovascolare beneficiano del trattamento con mipomersen, che riduce significativamente i livelli di LDL-C (differenza mipomersen-placebo: -28%, $p<0,001$) e Lp(a) (-21,1%, $p<0,001$) (11). Il principale evento avverso osservato durante lo studio clinico è stata la reazione nel sito di iniezione associata in alcuni casi a sindrome simil-influenzale (12). In alcuni pazienti è stato osservato un aumento delle transaminasi il cui significato clinico è ancora poco chiaro (11). Questo effetto è stato evidenziato anche in due meta-analisi che, pur confermando l'effetto ipolipemizzante di mipomersen, hanno comunque riportato un aumento degli enzimi epatici e steatosi (14, 15). Quest'ultimo effetto, osservato prevalentemente in studi a breve termine, sembra essere transitorio, in quanto studi a più lungo termine (fino a 104 settimane) hanno osservato un ritorno ai valori basali dei livelli epatici di TG

(16, 17). Biopsie epatiche di soggetti in trattamento con mipomersen hanno evidenziato la presenza di steatosi semplice non associata ad infiammazione o fibrosi (18), situazione successivamente confermata in uno studio a lungo termine condotto in pazienti con FH (sia HeFH che HoFH) (19). L'aumento dell'incidenza di steatosi è la conseguenza diretta del meccanismo d'azione del farmaco e implica la necessità di associare una dieta controllata povera in lipidi durante la terapia con mipomersen.

Inclisiran

Inclisiran è un oligonucleotide sintetico di RNA a doppio filamento (siRNA) disegnato con nucleotidi modificati per aumentarne l'emivita (7) e coniugato con tre molecole di N-acetilgalattosamina (GalNAc), che, attraverso il legame ai recettori ASGPR, abbondantemente espressi nel fegato, favoriscono la distribuzione del farmaco negli epatociti con elevata selettività. Il siRNA è disegnato per silenziare in modo selettivo PCSK9 nel fegato (7). PCSK9 è una proteina che regola i livelli di LDL-C attraverso il controllo dell'emivita di LDLR (5). Livelli elevati di PCSK9 portano ad una riduzione dell'espressione di LDLR e, come conseguenza, a elevati livelli di LDL-C; viceversa, l'inibizione di PCSK9 induce aumento dei livelli di LDLR e aumento del catabolismo delle LDL (5).

Studi di fase 1 condotti in volontari sani con livelli plasmatici di LDL-C ≥ 100 mg/dL hanno mostrato che il trattamento con inclisiran per 3 mesi riduce significativamente i livelli di PCSK9 (~70% con dosaggi >300 mg) e LDL-C (~50% con dosaggi >100 mg) (7). Durante il periodo di trattamento non sono stati riportati eventi avversi clinicamente rilevanti. Successivamente, inclisiran è stato testato in

pazienti ad alto rischio cardiovascolare e con livelli di LDL-C >70 mg/dL in presenza di pregressa malattia cardiovascolare aterosclerotica o >100 mg/dL in assenza di malattia cardiovascolare (20). I pazienti sono stati randomizzati in due gruppi: il primo ha ricevuto una singola somministrazione di inclisiran (200, 300 o 500 mg) mentre il secondo due somministrazioni (la prima al giorno 1 e la seconda al giorno 90; 100, 200 o 300 mg) (20). A sei mesi dalla somministrazione della prima dose, i livelli di LDL-C sono risultati significativamente inferiori in entrambi i gruppi rispetto al basale, con riduzioni medie da -28% a -42% nel gruppo che ha ricevuto la singola somministrazione e da -35% a -53% nel gruppo che ha ricevuto due somministrazioni (20). La riduzione maggiore è stata osservata nel gruppo che ha ricevuto il dosaggio di 300 mg e due somministrazioni; il 48% dei pazienti trattati in questo gruppo sperimentale ha raggiunto livelli di LDL-C inferiori a 50 mg/dL (20).

È interessante sottolineare come i livelli di LDL-C si siano mantenuti ridotti fino a 240 giorni dopo la prima somministrazione (20). Inclisiran è attualmente in attivo sviluppo clinico e i principali studi ne stanno valutando la sicurezza e l'efficacia anche in pazienti FH (NCT03397121, NCT02963311). È attualmente in preparazione ORION-4, uno studio di *outcome* cardiovascolari che arruolerà oltre 15.000 pazienti con malattia cardiovascolare aterosclerotica che assumeranno il farmaco per circa 5 anni.

Ad oggi, i dati disponibili mostrano che inclisiran mantiene la sua efficacia nel diminuire i livelli di LDL-C con un regime posologico di 2 somministrazioni all'anno rispetto alle 12-16 somministrazioni annue degli anticorpi monoclonali anti-PCSK9 o la somministrazione giornaliera di altri

farmaci ipolipemizzanti. Una differenza importante di inclisiran rispetto agli anticorpi monoclonali è che il farmaco riduce sia i livelli circolanti che quelli intracellulari (epatici) di PCSK9; l'effetto sui livelli intracellulari potrebbe contribuire a migliorare l'efficacia ma potrebbe anche smascherare effetti inattesi legati al blocco di PCSK9. Gli studi in corso saranno cruciali per rispondere a questi quesiti.

Silenziamento genico per il controllo dell'ipertrigliceridemia

La comprensione dei meccanismi molecolari responsabili del controllo del metabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi (TG) ha portato negli ultimi 10-15 anni a identificare e caratterizzare diversi fattori che agiscono come inibitori o attivatori delle lipasi. Sulla base di queste osservazioni, la ricerca farmacologica si è orientata verso lo studio di strategie per controllare quelle proteine che inibiscono l'attività delle lipasi, e in particolare della lipasi lipoproteica (LPL), o che concorrono a rallentarne il catabolismo. Apolipoproteina CIII e angiopoietina-like 3 rappresentano due di queste proteine e ad oggi sono in corso diversi studi clinici per valutare l'efficacia di strategie di silenziamento genico su questi target per il trattamento delle iperlipidemie miste o dell'ipertrigliceridemia (*Figura 2, Tabella 1*).

Volanesorsen

Apolipoproteina CIII (apoCIII) è una proteina sintetizzata prevalentemente nel fegato che svolge un ruolo chiave nel controllare i livelli circolanti di TG, chilomicroni e lipoproteine ricche in TG, mediante diversi meccanismi. ApoCIII infatti, inibisce l'attività della lipoproteina lipasi (LPL), enzima chiave nel metaboli-

simo delle lipoproteine ricche in TG, interferisce con il legame di apoB o apoE a recettori epatici, inibendo quindi il catabolismo delle lipoproteine remnant, e influenza il processo epatico di assemblaggio e secrezione delle VLDL (21). Elevati livelli plasmatici di apoCIII sono associati alla progressione della malattia cardiovascolare indipendentemente dagli altri fattori di rischio (22). La riduzione di 1 mg/dL dei livelli plasmatici di apoCIII si associa a una riduzione del 4% del rischio di malattia coronarica (23); in linea con questa osservazione, individui portatori di mutazioni *loss-of-function* (LOF) di apoCIII hanno ridotti livelli di TG e un rischio significativamente ridotto di malattia coronarica (-40%) (23) e di malattia cardiovascolare ischemica (~-40%) (24). Queste osservazioni supportano l'inibizione di apoCIII come possibile approccio per il trattamento dell'ipertrigliceridemia (HTG). Infatti molti farmaci ipolipemizzanti usati per ridurre i livelli di TG, inclusi fibrati, statine, e acidi grassi polinsaturi omega-3, agiscono riducendo i livelli di apoCIII (21) del 10-30%; tuttavia, un'importante riduzione del rischio cardiovascolare è stata osservata quando i livelli di apoCIII scendono almeno del 50%, come nel caso dei soggetti portatori di mutazioni LOF. Questo ha portato la ricerca farmacologica a testare l'efficacia di un trattamento basato sul silenziamento genico di apoCIII.

Volanesorsen (ISIS-APOCIII_{Rx}) è un ASO modificato di seconda generazione ideato per ridurre la sintesi epatica e i livelli circolanti di apoCIII. Dati preclinici in diversi modelli animali hanno dimostrato che volanesorsen inibisce la sintesi di apoCIII (riduzione dell'mRNA: 66%-98%) e riduce massivamente i livelli di TG (fino all'89%) e VLDL, con un buon profilo di tolleranza e sicurezza, senza de-

terminare aumentata deposizione epatica di TG o epatotossicità (25). Studi di fase I in volontari sani hanno riportato una riduzione dose-dipendente dei livelli di apoCIII (19,7%→77%) e TG (19,5%→43,8%) in seguito a trattamento con volanesorsen per circa 3 settimane, senza mostrare cambiamenti importanti nei livelli degli enzimi epatici (25). Gli studi di fase 2 hanno dimostrato l'efficacia di volanesorsen sia in monoterapia sia in combinazione con fibrati in soggetti con diverse forme di HTG (26-28). Il farmaco è risultato efficace in pazienti con diabete di tipo 2 e HTG portando anche ad un miglioramento della sensibilità all'insulina (29). In soggetti affetti da sindrome da chilomicronemia familiare (FCS), una dislipidemia genetica causata da mutazioni nel gene LPL o in geni che codificano per proteine che modulano l'attività di LPL e caratterizzata da elevati livelli di chilomicroni e severa HTG (30), volanesorsen riduce i livelli circolanti di apoCIII fino al 70-90% con una conseguente riduzione dei livelli di TG dal 55 all'85% (31). Gli studi di fase 3 APPROACH (condotto in pazienti con FCS) e COMPASS (condotto in pazienti con HTG) hanno confermato l'efficacia di volanesorsen nel ridurre in modo significativo i livelli plasmatici di TG (del 77% e del 71%, rispettivamente) (32, 33); questo effetto è stato associato anche alla riduzione della frequenza di pancreatiti che caratterizza i pazienti affetti da FCS (33, 34). Durante il trattamento non sono stati osservati eventi avversi a livello renale o epatico; nello studio APPROACH è stata osservata una riduzione della conta piastrinica che ha portato 5 soggetti a sospendere lo studio (2 dei quali con conte <25,000/μl, risolto con la sospensione del trattamento) (32), mentre non è stata riscontrata trombocitopenia nello studio COMPASS (33). Anomalie della coagula-

zione e trombocitopenia sono stati riportati anche in seguito alla somministrazione di altri ASO, suggerendo la possibilità di un effetto di classe. Tuttavia, l'analisi dei dati ottenuti in diversi studi clinici che hanno testato l'effetto degli ASO non ha riportato evidenze di trombocitopenia clinicamente rilevanti (35).

Attualmente è anche in corso uno studio per la valutazione di volanesorsen in pazienti con lipodistrofia parziale familiare (BROADEN, NCT02527343), patologia caratterizzata da HTG, anomalie nella distribuzione del grasso corporeo e disordini metabolici quali insulino-resistenza, steatosi epatica, dislipidemia. Lo studio, oltre a indagare la riduzione dei livelli di TG dopo 13 settimane di trattamento, valuterà anche variazioni del contenuto di grasso epatico.

ANGPTL3LRx

Angiopietina-like 3 (ANGPTL3) è un inibitore endogeno di due enzimi coinvolti nel metabolismo delle lipoproteine, LPL e lipasi endoteliale (EL) (36). La mancanza del gene *ANGPTL3* in topi apoE KO riduce notevolmente la formazione di placca aterosclerotica (37). Nell'uomo, mutazioni LOF nel gene *ANGPTL3* sono associate a ridotti livelli di TG, LDL-C e HDL-C e a una significativa riduzione del rischio di malattia coronarica e di infarto del miocardio. In accordo, soggetti con livelli di ANGPTL3 nel terzile più basso hanno una significativa riduzione del rischio di infarto miocardico rispetto a soggetti con livelli nel terzile più alto (38, 39). Queste osservazioni hanno suggerito ANGPTL3 come possibile target farmacologico per il trattamento delle iperlipidemie miste, ed è interessante il fatto che l'attività ipocolesterolemizzante sia indipendente dal recettore LDL, suggerendo che l'inibizione farmacologica di questa proteina potrebbe

avere un'importante applicazione anche nel trattamento dei pazienti FH (40). Sono stati sviluppati due approcci per inibire ANGPTL3, uno mediante l'utilizzo di un anticorpo monoclonale (evinacumab), l'altro tramite il metodo del silenziamento genico. ANGPTL3_{Rx}, rappresenta un oligonucleotide antisense di seconda generazione contenente nucleotidi modificati che conferiscono un'aumentata affinità per l'mRNA target, una maggiore resistenza a endonucleasi ed esonucleasi e una ridotta tossicità alle alte dosi, associato quindi a un migliore profilo di sicurezza (41). Il composto è stato inoltre modificato per migliorare l'attività dell'enzima RNasi H1 attraverso l'introduzione di modificazioni nella porzione centrale dell'oligonucleotide (41). L'ulteriore evoluzione della sintesi degli ASO ha portato a formulare ANGPTL3-L_{Rx}, un ASO di terza generazione a cui sono stati legati covalentemente tre residui di GalNac per favorire il riconoscimento specifico da parte dei recettori ASGPR del fegato (41), aumentandone l'efficacia nel tessuto che la produce maggiormente e permettendo la riduzione del dosaggio.

In diversi modelli animali, il trattamento con ANGPTL3_{Rx} ha ridotto notevolmente i livelli di proteina ANGPTL3, con contemporanea riduzione dei livelli di TG, LDL-C, contenuto epatico di TG, progressione dell'aterosclerosi e miglioramento della sensibilità all'insulina (41). La somministrazione per 6 settimane in soggetti con elevati livelli di TG plasmatici ha prodotto una riduzione dose-dipendente dei livelli circolanti di proteina ANGPTL3 (47%-84%), associata ad una riduzione dei livelli di TG (33%-63%), LDL-C (1.3%-33%), VLDL-C (28%-60%) e apoCIII (19%-59%) (41). Durante il trattamento non sono stati riportati eventi avversi gravi, e rispetto agli ASO delle precedenti generazioni non

è stata riportata evidenza di effetti pro-trombotici, episodi di sanguinamento, riduzione della conta piastrinica, suggerendo il superamento dei problemi legati alla formulazione dell'ASO con oligonucleotidi fosforotioati (41).

Silenziamento genico per il controllo di elevati livelli di lipoproteina (a)

ISIS-APO(a)Rx

Numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato come livelli elevati di lipoproteina (a) (Lp(a)) si associno ad aumentato rischio cardiovascolare (42). Più recentemente, studi genetici hanno suggerito un ruolo causale per Lp(a) nella comparsa di infarto al miocardio, malattia ischemica e stenosi alla valvola aortica (43-46). I meccanismi attraverso i quali Lp(a) favorisce l'aterotrombosi sono ancora discussi e coinvolgono sia la componente LDL che apo(a). Quest'ultima sembra avere un'importante ruolo pro-infiammatorio, associato a disfunzione endoteliale, aumento del reclutamento di monociti nella parete vascolare, maturazione a macrofagi e trasformazione in cellule schiumose; inoltre rappresenta una molecola in grado di trasportare fosfolipidi ossidati ma anche di inibire la fibrinolisi (47).

Queste osservazioni hanno supportato lo sviluppo di strategie farmacologiche volte a controllare Lp(a). Tra queste sembra essere particolarmente promettente la possibilità di silenziare apo(a) (*Figura 2*) ed a questo scopo è stato generato un oligonucleotide antisense in grado di ridurre l'espressione epatica e la concentrazione plasmatica di apo(a) nei primati di più dell'80% (48). Gli studi di fase I hanno mostrato come sei somministrazioni di ASO (ISIS-APO(a)_{Rx}) a dosaggi da 100 a 300 mg in soggetti con

livelli di Lp(a) attorno ai 40 mg/dL porti ad una riduzione dei livelli di Lp(a) dose-dipendente dal 40% fino al 78% (49). Successivamente sono state apportate modifiche alla molecola per favorirne la veicolazione epatica attraverso l'aggiunta di GalNac che favorisce il riconoscimento selettivo da parte del recettore epatico ASGPR. Questo ASO di terza generazione (ISIS-APO(a)-L_{Rx}) è risultato essere 30 volte più potente di quello precedente, permettendo di utilizzare dosaggi di farmaco inferiori (10-40 mg). I dati degli studi di fase II hanno mostrato in pazienti con livelli di Lp(a) al basale attorno ai 60 mg/dL una riduzione dei livelli fino al 92% (50) (Tabella 1). Non sono stati osservati effetti collaterali maggiori nei pazienti trattati con ASO, tuttavia nel 20% dei pazienti sono emersi sintomi collegati a risposta simil-influenzale. Attualmente è in corso uno studio di fase 2b con lo scopo di verificare la sicurezza e l'efficacia di diversi dosaggi di APO(a)-L_{Rx} in 270 pazienti con elevati livelli di apo(a) (NCT03070782) ed i risultati sono attesi per fine 2018. I risultati di questo studio saranno cruciali per decidere dosaggio e frequenza di somministrazione per gli studi di fase III pianificati per valutare il beneficio della terapia sull'*outcome* cardiovascolare.

È importante ricordare come basse concentrazioni di Lp(a) siano state associate con un aumento del rischio di diabete di tipo II (51, 52), in particolare per livelli inferiori a 5 mg/dL. Dato che una terapia aggressiva con gli ASO potrebbe ridurre fino al 90% i livelli di Lp(a), questo aspetto andrà monitorato con attenzione negli studi futuri; tuttavia è difficile ipotizzare

che in pazienti con livelli elevati di Lp(a) la terapia con ASO anti-apo(a) riduca Lp(a) a livelli così bassi. L'osservazione che livelli elevati di Lp(a) sono associati a protezione da sanguinamenti maggiori nel cervello e nelle vie aeree (53) suggerisce anche la necessità di valutare negli studi clinici di *outcome* cardiovascolare se un approccio aggressivo di riduzione dei livelli di Lp(a) possa aumentare il rischio di sanguinamento.

Dato il ruolo causale di Lp(a) nella malattia cardiovascolare, la riduzione dei suoi livelli nei soggetti a rischio cardiovascolare rappresenterà uno degli obiettivi terapeutici futuri e la strategia di silenziamento genico è ad oggi quella in fase più avanzata di sviluppo clinico.

Conclusioni e prospettive future

L'approccio di silenziamento genico con ASO o con siRNA rappresenta un passo decisivo verso lo sviluppo di una terapia personalizzata anche nell'ambito delle dislipidemie. L'evoluzione del disegno di questi farmaci ha portato allo sviluppo di molecole con un ottimo profilo farmacocinetico che permettono di ridurre la frequenza di somministrazione e di migliorare il profilo di sicurezza. Numerosi studi clinici supportano l'efficacia dei diversi trattamenti nel ridurre i livelli di lipidi o lipoproteine circolanti; tuttavia è necessario attendere i risultati degli studi di follow-up a lungo termine per capire se la riduzione dei livelli di lipidi circolanti si possa tradurre in un beneficio cardiovascolare e rassicurare sul profilo di sicurezza e tollerabilità di questo approccio farmacologico.

RIASSUNTO

Nonostante i progressi nel trattamento delle dislipidemie, c'è ancora la necessità di sviluppare nuovi approcci farmacologici in grado di correggere le alterazioni nel metabolismo di lipidi/lipoproteine per ridurre il rischio cardiovascolare residuo, che persiste anche nei pazienti trattati con terapia ottimale. Negli ultimi anni, il meccanismo fisiologico di silenziamento genico, un processo post-trascrizionale tramite cui le cellule regolano l'espressione genica "spegnendo" selettivamente geni specifici, è stato traslato in ambito farmacologico e, in particolare, è stata sviluppata una tecnologia basata sia su oligonucleotidi antisenso a singolo filamento (ASO) che su piccoli RNA a doppio filamento (siRNA) in grado di inibire l'espressione di specifici geni coinvolti nel metabolismo lipidico. Tra questi sono stati sviluppati oligonucleotidi antisenso contro gli mRNA che codificano per apolipoproteina B, la principale proteina presente nelle lipoproteine aterogene, apolipoproteina CIII o angiopoietina-like 3, coinvolte nella regolazione dei livelli di trigliceridi, o apolipoproteina(a), per ridurre i livelli di lipoproteina(a). È stato sviluppato anche un siRNA per inibire PCSK9, una proteina che regola i livelli circolanti di colesterolo LDL. Questi approcci di silenziamento genico sono altamente specifici e quindi possono essere usati a basse dosi e somministrati con frequenze inferiori rispetto alle terapie convenzionali. Rispetto alle prime generazioni di ASO o siRNA, le modificazioni introdotte nelle molecole hanno permesso di migliorare il quadro degli effetti tossici off-target. Gli studi clinici condotti finora hanno dimostrato l'efficacia di questo tipo di approccio, ma sono necessari ulteriori studi per valutare sia la sicurezza a lungo termine che l'efficacia in termini di protezione cardiovascolare.

Parole chiave: *Silenziamento genico; oligonucleotidi antisenso; siRNA; dislipidemia; malattia cardiovascolare.*

Bibliografia

1. Watts JK, Corey D.R. Silencing disease genes in the laboratory and the clinic. *J Pathol.* 2012; 226: 365-379.
2. Frazier KS. Antisense oligonucleotide therapies: the promise and the challenges from a toxicologic pathologist's perspective. *Toxicol Pathol.* 2015; 43: 78-89.
3. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998; 391: 806-811.
4. Norata GD, Ballantyne CM, Catapano AL. New therapeutic principles in dyslipidaemia: focus on LDL and Lp(a) lowering drugs. *Eur Heart J.* 2013; 34: 1783-1789.
5. Norata GD, Tibolla G, Catapano AL. Targeting PCSK9 for hypercholesterolemia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2014; 54: 273-293.
6. Norata GD, Tibolla G, Catapano AL. Gene silencing approaches for the management of dyslipidaemia. *Trends Pharmacol Sci.* 2013; 34: 198-205.
7. Fitzgerald K, White S, Borodovsky A, Bettencourt BR, Strahs A, Clausen V, et al. A Highly Durable RNAi Therapeutic Inhibitor of PCSK9. *N Engl J Med.* 2017; 376: 41-51.
8. Sniderman AD, Williams K, Contois JH, Monroe HM, McQueen MJ, de Graaf J, Furberg CD. A meta-analysis of low-density lipoprotein cholesterol, non-high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein B as markers of cardiovascular risk. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* 2011; 4: 337-345.
9. Crooke ST, Geary RS. Clinical pharmacological properties of mipomersen (Kynamro), a second generation antisense inhibitor of apolipoprotein B. *Br J Clin Pharmacol.* 2013; 76: 269-276.
10. Akdim F, Visser ME, Tribble DL, Baker BF, Stroes ES, Yu R, et al. Effect of mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, on low-density lipoprotein cholesterol in patients with familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol.* 2010; 105: 1413-1419.
11. Stein EA, Dufour R, Gagne C, Gaudet D, East C, Donovan JM, et al. Apolipoprotein B synthesis inhibition with mipomersen in heterozygous familial hypercholesterolemia: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial to assess efficacy and safety as add-on therapy in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2012; 126: 2283-2292.
12. Raal FJ, Santos RD, Blom DJ, Marais AD, Chang MJ, Cromwell WC, et al. Crooke, Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2010; 375: 998-1006.

13. Geary RS, Baker BF, Crooke ST. Clinical and preclinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mipomersen (kynamro[®]): a second-generation antisense oligonucleotide inhibitor of apolipoprotein B. *Clin Pharmacokinet*. 2015; 54: 133-146.
14. Li N, Li Q, Tian XQ, Qian HY, Yang YJ. Mipomersen is a promising therapy in the management of hypercholesterolemia: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2014; 14: 367-376.
15. Panta R, Dahal K, Kunwar S. Efficacy and safety of mipomersen in treatment of dyslipidemia: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Clin Lipidol*. 2015; 9: 217-225.
16. Sahebkar A, Watts GF. New LDL-cholesterol lowering therapies: pharmacology, clinical trials, and relevance to acute coronary syndromes. *Clin Ther*. 2013; 35: 1082-1098.
17. Toth PP. Emerging LDL therapies: Mipomersen-antisense oligonucleotide therapy in the management of hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol*. 2013; 7: S6-10.
18. Hashemi N, Odze RD, McGowan MP, Santos RD, Stroes ES, Cohen DE. Liver histology during Mipomersen therapy for severe hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol*. 2014; 8: 606-611.
19. Santos RD, Duell PB, East C, Guyton JR, Moriarty PM, Chin W, Mittleman RS. Long-term efficacy and safety of mipomersen in patients with familial hypercholesterolaemia: 2-year interim results of an open-label extension. *Eur Heart J*. 2015; 36: 566-575.
20. Ray KK, Landmesser U, Leiter LA, Kallend D, Dufour R, Karakas M, et al. Inclisiran in Patients at High Cardiovascular Risk with Elevated LDL Cholesterol. *N Engl J Med*. 2017; 376: 1430-1440.
21. Norata GD, Tsimikas S, Pirillo A, Catapano AL. Apolipoprotein C-III: From Pathophysiology to Pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*. 2015; 36: 675-687.
22. Ooi EM, Barrett PH, Chan DC, Watts GF. Apolipoprotein C-III: understanding an emerging cardiovascular risk factor. *Clin Sci (Lond)*. 2008; 114: 611-624.
23. Crosby J., Peloso G.M., Auer P.L., Crosslin D.R., Stitzel N.O., Lange L.A., et al. Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease. *N Engl J Med*. 2014; 371: 22-31.
24. Jorgensen 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.
25. Graham MJ, Lee RG, Bell TA 3rd, Fu W, Mullick AE, Alexander VJ, et al. Antisense oligonucleotide inhibition of apolipoprotein C-III reduces plasma triglycerides in rodents, nonhuman primates, and humans. *Circ Res*. 2013; 112: 1479-1490.
26. Gaudet D, Alexander VJ, Baker BF, Brisson D, Tremblay K, Singleton W, et al. Antisense inhibition of apolipoprotein C-III in patients with hypertriglyceridemia. *N Engl J Med*. 2015; 373: 438-447.
27. Yang X, Lee SR, Choi YS, Alexander VJ, Digenio A, Yang YI, et al. Reduction in lipoprotein-associated apoC-III levels following volanesorsen therapy: phase 2 randomized trial results. *J Lipid Res*. 2016; 57: 706-713.
28. Alexander VJ, Gaudet D, Brisson D, Flaim J, Hughes S, Singleton W, Geary RS. Antisense inhibitor of apoC-III produces significant decreases in apoC-III and triglycerides and increases in HDL-C as a single agent or in combination with fibrates in hypertriglyceridemic patients. *European Heart Journal*. 2014; 35: 218-219.
29. Digenio A, Dunbar RL, Alexander VJ, Hompesch M, Morrow L, Lee RG, et al. Antisense-Mediated Lowering of Plasma Apolipoprotein C-III by Volanesorsen Improves Dyslipidemia and Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2016; 39: 1408-1415.
30. Brahm AJ, Hegele RA. Chylomicronaemia—current diagnosis and future therapies. *Nat Rev Endocrinol*. 2015; 11: 352-362.
31. Gaudet D, Brisson D, Tremblay K, Alexander VJ, Singleton W, Hughes SG, et al. Targeting APOC3 in the familial chylomicronemia syndrome. *N Engl J Med*. 2014; 371: 2200-2206.
32. Gaudet D, Digenio A, Alexander VJ, Arca M, Jones AF, Stroes E, et al. The APPROACH Study: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Study of Volanesorsen Administered Subcutaneously to Patients with Familial Chylomicronemia Syndrome (FCS). *J Clin Lipidol*. 2017; 11: 814-815.
33. Gouni-Berthold I, Alexander V, Digenio A, Dufour R, Steinhagen-Thiessen E, Martin S, et al. Apolipoprotein C-III Inhibition With Volanesorsen in Patients With Hypertriglyceridemia (COMPASS): A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J Clin Lipidol*. 2017; 11: 794-795.
34. Gelrud A, Digenio A, Alexander V, Williams K, Hsieh A, Gouni-Berthold I, et al. Treatment with Volanesorsen (VLN) Reduced Triglycerides and Pancreatitis in Patients with FCS and sHTG vs Placebo: Results of the APPROACH and COMPASS. *J Clin Lipidol*. 2018; 12: 537.
35. Crooke ST, Baker BF, Witztum JL, Kwoh TJ, Pham NC, Salgado N, et al. The Effects of 2'-O-Methoxyethyl Containing Antisense Oligo-

- nucleotides on Platelets in Human Clinical Trials. *Nucleic Acid Ther.* 2017; 27: 121-129.
36. Tikka A, Jauhiainen M. The role of ANGPTL3 in controlling lipoprotein metabolism. *Endocrine.* 2016; 52: 187-193.
 37. Ando Y, Shimizugawa T, Takeshita S, Ono M, Shimamura M, Koishi R, Furukawa H. A decreased expression of angiopoietin-like 3 is protective against atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Lipid Res.* 2003; 44: 1216-1223.
 38. Stitzel NO, Khera AV, Wang X, Bierhals AJ, Vourakis AC, Sperry AE, et al. Myocardial Infarction Genetics Consortium, ANGPTL3 Deficiency and Protection Against Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 69: 2054-2063.
 39. Dewey FE, Gusarova V, Dunbar RL, O'Dushlaine C, Schurmann C, Gottesman O, et al. Genetic and Pharmacologic Inactivation of ANGPTL3 and Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2017; 377: 211-221.
 40. Wang Y, Gusarova V, Banfi S, Gromada J, Cohen JC, Hobbs HH. Inactivation of ANGPTL3 reduces hepatic VLDL-triglyceride secretion. *J Lipid Res.* 2015; 56: 1296-1307.
 41. Graham MJ, Lee RG, Brandt TA, Tai LJ, Fu W, Peralta R, et al. Cardiovascular and Metabolic Effects of ANGPTL3 Antisense Oligonucleotides. *N Engl J Med.* 2017; 377: 222-232.
 42. Nordestgaard BG, Langsted A. Lipoprotein (a) as a cause of cardiovascular disease: insights from epidemiology, genetics, and biology. *J Lipid Res.* 2016; 57: 1953-1975.
 43. Clarke R, Peden JF, Hopewell JC, Kyriakou T, Goel A, Heath SC, et al. Consortium, Genetic variants associated with Lp(a) lipoprotein level and coronary disease. *N Engl J Med.* 2009; 361: 2518-2528.
 44. Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Nordestgaard BG. Genetically elevated lipoprotein(a) and increased risk of myocardial infarction. *Jama.* 2009; 301: 2331-2339.
 45. Thanassoulis G, Campbell CY, Owens DS, Smith JG, Smith AV, Peloso GM, et al. C.E.C.W. Group, Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *N Engl J Med.* 2013; 368: 503-512.
 46. Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Extreme lipoprotein(a) levels and improved cardiovascular risk prediction. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 61: 1146-1156.
 47. Kronenberg F, Utermann G. Lipoprotein(a): resurrected by genetics. *J Intern Med.* 2013; 273: 6-30.
 48. Graham MJ, Viney N, Croke RM, Tsimikas S. Antisense inhibition of apolipoprotein (a) to lower plasma lipoprotein (a) levels in humans. *J Lipid Res.* 2016; 57: 340-351.
 49. Tsimikas S, Viney NJ, Hughes SG, Singleton W, Graham MJ, Baker BF, et al. Antisense therapy targeting apolipoprotein(a): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 1 study. *Lancet.* 2015; 386: 1472-1483.
 50. Viney NJ, van Capellevean JC, Geary RS, Xia S, Tami JA, Yu RZ, et al. Antisense oligonucleotides targeting apolipoprotein(a) in people with raised lipoprotein(a): two randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trials. *Lancet.* 2016; 388: 2239-2253.
 51. Mora S, Kamstrup PR, Rifai N, Nordestgaard BG, Buring JE, Ridker PM. Lipoprotein(a) and risk of type 2 diabetes. *Clin Chem.* 2010; 56: 1252-1260.
 52. Kamstrup PR, Nordestgaard BG. Lipoprotein(a) concentrations, isoform size, and risk of type 2 diabetes: a Mendelian randomisation study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2013; 1: 220-227.
 53. Langsted A, Kamstrup PR, Nordestgaard BG. High Lipoprotein(a) and Low Risk of Major Bleeding in Brain and Airways in the General Population: a Mendelian Randomization Study. *Clin Chem.* 2017; 63: 1714-1723.