

FOCUS SUL METABOLISMO

APO C-III: TAPPA LIMITANTE DELLA CASCATA LIPOLITICA E BERSAGLIO TERAPEUTICO NELLE IPERTRIGLICERIDEMIE GRAVI

Apo C-III: limiting stage of the lipolytic cascade and therapeutic target in severe hypertriglyceridemias

LAURA D'ERASMO¹, SEBASTIANO CALANDRA²

¹Dipartimento di Scienze Cliniche e Specialità Mediche, "Sapienza" Università di Roma;

²Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena

SUMMARY

Hypertriglyceridemia is a complex disorder, in most cases of polygenic nature, affecting approximately 27% of the general population. The severity of hypertriglyceridemia correlates with different types of complications. In fact, the association between mild to moderate hypertriglyceridaemia and cardiovascular risk and severe hypertriglyceridemia (triglycerides >1.000 mg/dl) and risk of acute pancreatitis is known. Apolipoprotein C-III (apoC-III) plays a critical role in influencing triglyceride-rich lipoprotein metabolism through three main mechanisms:

- 1) it promotes the assembly and production of VLDL in the liver;
- 2) inhibits the activity of lipoprotein lipase;
- 3) interferes with ApoB or ApoE binding to hepatic receptors, slowing the removal of TRLs and their residues (remnants).

Both the studies conducted on animal models and in humans, have shown that apoC-III directly correlates with the elevation of circulating triglyceride concentrations while low or absent apoC-III levels determine a reduction. A great deal of evidence has shown that in humans the mutations with loss of function of the APOC-III gene are associated with low risk of atherosclerotic disease. All these data showed the possibility of using apoC-III as a therapeutic target in hypertriglyceridemia. Although some commercial drugs are able to reduce circulating apoC-III levels, they are often not sufficient to achieve therapeutic goals. For this reason, an Antisense Oligonucleotide (ASO) has recently been formulated to reduce apoC-III mRNA (volanesorsen) and consequently reduce triglyceridemia. In this review we will show the scientific evidence concerning the role of apoC-III in the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins (TRL) showing its importance as a possible therapeutic target for both severe hypertriglyceridemia (and its complications such as acute pancreatitis) that of the cardiovascular risk associated with high triglyceride levels.

Key words: *ApoCIII, severe hypertriglyceridemias, new drug therapies.*

Introduzione

L'ipertrigliceridemia è un disordine complesso, nella maggior parte dei casi di natura poligenica, che colpisce circa il 27% della popolazione generale. La concentrazione di trigliceridi riflette il bilancio tra:

- a) sintesi de novo delle lipoproteine ricche in trigliceridi (TRLs) da parte del fegato (very low density lipoprotein or VLDL);
- b) l'assorbimento intestinale di grassi proveniente dalla dieta (chilomicroni);
- c) la lipolisi nei tessuti periferici;
- d) la clearance epatica.

Considerate le evidenze di un'associazione tra ipertrigliceridemia e rischio cardiovascolare (CVD), vi è un crescente interesse nel determinare i fattori che modulano il metabolismo dei trigliceridi per identificare potenziali target terapeutici (1). Uno di questi fattori è l'apoproteina C-III (apoCIII), una glicoproteina di 8.8 kDa prodotta principalmente a livello epatico ed in minore misura a livello intestinale (2-4). Una volta secrete le apoCIII mature si trovano associate alle TRLs, LDL e HDL (5). Come dato molto importante, le apoCIII plasmatiche sono correlate positivamente ai trigliceridi plasmatici e al rischio cardiovascolare (6). Questa associazione viene confermata dall'osservazione che le mutazioni che influenzano negativamente i livelli di apoC-III (7) nell'uomo sono correlate a ridotti livelli di trigliceridi e protezione dalla malattia cardiovascolare (8-10).

Apolipoproteina C-III

L'Apolipoproteina C-III (apoC-III) è una piccola glicoproteina costituita, nella sua forma matura, da 79 aminoacidi (da

99 amino acidi nella forma di pre-proteina 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 normolipidemici, fino a 30 mg/dl ed oltre in pazienti con ipertrigliceridemia (11, 12). È presente nel plasma in tre isoforme che differiscono per il contenuto in acido sialico. La isoforma apoC-III₀ non contiene acido sialico, mentre le isoforme apoC-III₁ ed apoC-III₂ legano uno o due molecole di acido sialico rispettivamente. Le isoforme apoC-III₁ ed apoC-III₂ rappresentano >90% dell'apoC-III presente nel plasma. L'apoC-III è presente in tutte le classi di lipoproteine, ma è particolarmente rappresentata nei chilomicroni, nelle VLDL, nei loro residui (dunque in quelle che sono denominate lipoproteine ricche in trigliceridi o TRL) 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 (11, 12). Nei soggetti normo-trigliceridemici la maggior parte dell'apoC-III si trova sulla superficie delle HDL che rappresentano il "reservoir" di apoC-III nel plasma umano. L'ipertrigliceridemia è caratterizzata da elevati livelli di trigliceridi (TG) e, in particolare, di trigliceridi trasportati nelle VLDL con una significativa elevazione di apoC-III legato alle TRL. Nel caso di soggetti normo-trigliceridemici ogni molecola di VLDL contiene 25 molecole di apoC-III; questo valore si raddoppia nel caso di VLDL di soggetti ipertrigliceridemici (11, 12). In condizioni di ipertrigliceridemia, inoltre, si osserva uno *shift* tra il pattern di secrezione di TRL contenenti apoE (che vengono rimosse velocemente

Indirizzo per la corrispondenza

Laura D'Erasmus

Mail: laura.derasmus@uniroma1.it

dalla circolazione e hanno scarsa tendenza a formare colesterolo LDL) a favore della produzione di TRL ricche in apoC-III; questo comporta una più lunga permanenza in circolo delle lipoproteine e una maggiore conversione a colesterolo LDL (causata dalla ridotta *clearance* periferica).

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). L'espressione di *APOC3* nell'epatocita è regolato da molti componenti metabolici e nutrizionali inclusi il glucosio, l'insulina e gli acidi grassi (13, 14). Nelle culture primarie di epatocita di ratto e negli epatociti umani immortalizzati, elevati livelli di glucosio inducono l'espressione di *APOC3* nel fegato mediante l'attivazione di *carbohydrate response-element-binding protein* e dell'*hepatic nuclear factor-4 α* (13). In vivo questa osservazione si traduce con il fatto che i livelli plasmatici di apoC-III correlano positivamente con la glicemia sia a digiuno che post-prandiale negli individui obesi (13). Similmente elevati livelli post-prandiali di acidi grassi saturi aumentano i livelli plasmatici di apoC-III e la sua produzione epatica sia nel modello murino che nell'uomo (14, 15). Questa regolazione è probabilmente il risultato della induzione indotta dagli acidi grassi saturi dell'espressione del coattivatore *1 β del peroxisome proliferator activated receptor γ* (PGC1 β) (16). Regolatori negativi dell'espressione di apoC-III sono invece gli acidi grassi polinsaturi, gli agonisti del PPAR α e i segnali infiammatori che attivano NF-kB (13, 17-20).

ApoC-III e metabolismo lipoproteico

Il meccanismo prevalente attraverso il quale l'apoC-III modula il metabolismo delle lipoproteine è ancora controverso.

L'apoC-III, non solo agisce come inibitore della LPL ma:

- 1) ostacola la clearance epatica delle TRL;
- 2) promuove la produzione epatica di VLDL (*Figura 1*) (21).

L'ipotesi che l'attività di apoC-III non sia limitata ad agire come inibitore di LPL deriva dal fatto che molti degli studi che hanno legato l'attività di apoC-III all'inibizione LPL mediata dell'idrolisi dei trigliceridi, sono basati sull'utilizzo di concentrazione sopra-fisiologiche di apoC-III. In queste condizioni l'apoC-III compete attraverso il suo residuo aromatico C-terminale per il legame della LPL alle TRL. L'interpretazione di questi dati è che il rapporto tra apoC-II, agonista di LPL, e apoC-III sulle TRL sia cruciale per l'attività della LPL. In questo modo, l'apoC-III impatterebbe sull'attività LPL solo quando si trova sulle TRL in concentrazioni 5 volte superiori (condizione che non si osserva né in condizioni normali che di patologia). Questa ipotesi sarebbe supportata anche da dati sperimentali sul topo transgenico *knockout* per *APOC3* in cui l'ipertrigliceridemia viene spiegata dall'assenza della inibizione apoC-III mediata dell'attività LPL (22, 23). Tuttavia, l'inibizione della LPL osservata in questo modello soffre della sproporzione delle concentrazioni di apoC-II e apoC-III sulle lipoproteine; infatti, l'inibizione della LPL è spesso osservata in molti dei modelli murini in cui le apoproteine (in particolare, apoAV, apoC-I, apoC-II e apoE) sono sovra-esprese (24-27). Il limite di questi modelli sarebbe legato al fatto che l'iper-espressione delle apolipoproteine sulla superficie delle TRL ne limiti l'accesso da parte della LPL. Un ulteriore problematica legato all'utilizzo di questi modelli sperimentali è il fatto che viene utilizzata LPL libera invece che quella ancorata alla proteina GPIHBP1. GPIHBP1 è una proteina fondamentale per la traslocazione della

LPL sulla superficie luminale dei capillari dove presenta naturalmente la LPL sulle cellule endoteliali creando una piattaforma grazie alla quale la LPL può esercitare la propria attività lipolitica (28). A conferma di questo, Larsson et al. (29), in uno studio in vitro, hanno riportato come l'effetto inibitore di apoC-III fosse significativamente maggiore quando veniva utilizzata LPL legata a GPIHBP1 piuttosto che quando veniva utilizzata LPL libera.

Lo studio clinico condotto su pazienti affetti da Sindrome Chilomicronemi-

ca Familiare (FCS) trattati con un ASO di seconda generazione diretto verso *APOC3* epatico, ha messo in discussione drammaticamente l'importanza fisiologica dell'inibizione della LPL mediata da apoC-III negli esseri umani. I pazienti affetti da FCS sono caratterizzati da livelli di trigliceridi plasmatici estremamente alti (2000 mg/dl) come risultato di un'attività LPL plasmatica non rilevabile (<5% del livello normale) a causa di mutazioni genetiche nel gene *LPL* o nei suoi cofattori (*APOC2*, *APOAV*, fattore di maturazione della lipa-

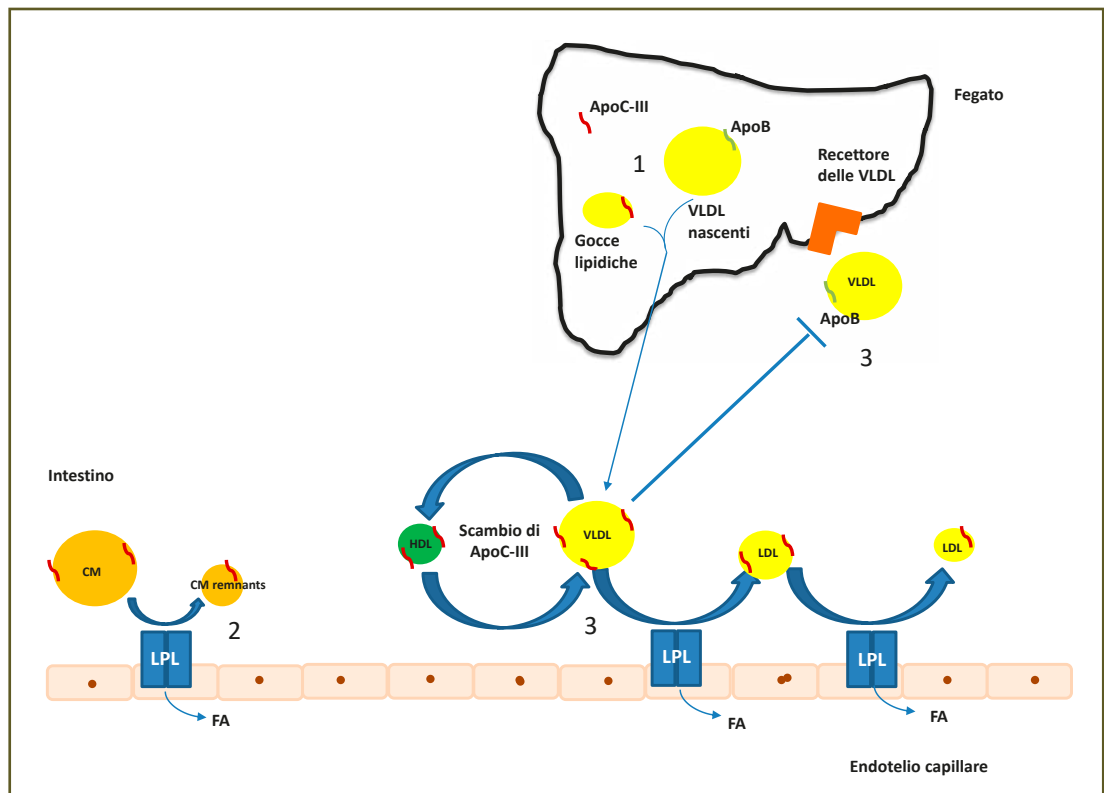


Figura 1 - ApoC-III e metabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi (TRL).

Apolipoproteina C-III (ApoC-III) e Triglyceride (TG)-rich Lipoprotein (TRL) Metabolism. ApoCIII si trova prevalentemente a livello dei chilomicroni (CM), very low-density lipoproteins (VLDL), e high-density lipoproteins (HDL), e in minore misura all'LDL. ApoC-III influenza il metabolismo delle TRL attraverso diversi meccanismi: 1) favorisce l'assemblaggio e la produzione delle VLDL a livello epatico 2) inibisce l'attività della lipoprotein lipasi 3) interferisce con il legame dell'ApoB o ApoE ai recettori epatici, così rallentando la rimozione delle TRL e dei loro remnant. Durante l'idrolisi LPL mediata dei trigliceridi contenuti nelle VLDL, ApoC-III si muove dalle VLDL alle HDL con un trasferimento che è proporzionale alla magnitudine degli acidi grassi (FA) rilasciati [77].

si-1 (*LMF1*), *GPIHBP1*) (30). Sorprendentemente, Gaudet et al. (30) hanno riportato come la riduzione indotta dall'ASO dei livelli plasmatici di apoC-III in tre pazienti FCS (con mutazioni in omozigosi nel gene *LPL*), fosse associata a una drastica riduzione dei loro livelli plasmatici di trigliceridi. Questa osservazione ha suggerito il fatto che apoC-III possa agire anche in modo indipendente dalla LPL suggerendo la presenza di un'altra *patway* di idrolisi dei trigliceridi. A supporto di questa ipotesi, in uno studio su alcuni tipi di topi knockout per i recettori epatici per le TRL, si è evidenziato come apoC-III agisca prevalentemente andando ad inibire la clearance epatica delle TRL (31). In condizioni fisiologiche, dopo il processo di lipolisi, i *remnant* delle TRL subiscono una rapida clearance da parte del fegato mediante recettori situati sulla membrana basale degli epatociti. A livello epatico, i recettori endocitici più rappresentati comprendono il recettore LDL (LDLR), la proteina 1 correlata all'LDLR (LRP1) e i proteoglicani di heparan solfato (HSPG), in particolare syndecan-1 (SDC1) (31, 32). Il trattamento con ASO anti apoC-III riduceva del 35-50% la trigliceridemia plasmatica nei seguenti modelli murini: nei knockout per LPL, per HSPG, LDLR o LRP1 come anche negli animali difettivi sia per i geni codificanti per HSPG che LRLR o LRP1. Tuttavia, la somministrazione di ASO anti apoC-III non aveva alcun effetto sul metabolismo plasmatico dei trigliceridi nei topi privi sia di LDLR e LRP1. La somministrazione dell'ASO anti apoC-III non aveva, al contrario, alcun effetto sulla secrezione delle VLDL, sulla riduzione eparino-indotta dei trigliceridi o sull'*uptake* dei lipidi a livello cardiaco o del muscolo scheletrico. Questi dati suggeriscono che apoC-III possa indurre ipertrigliceridemia inibendo la *clearance* epatica delle TRL mediata da

LDLR e LRP1 (31-33). Una grande mole di lavori ha stabilito il ruolo di HSPGs nella clearance epatica dei *remnant* delle TRL. In coltura, i HSPGs possono interagire direttamente con le lipasi e le apolipoproteine facilitandone l'endocitosi. Nello stesso studio (31), i topi knockout per SDC1 accumulavano TRL ricche in apoC-III (31-33) suggerendo che la rimozione delle TRL ricche di apoC-III avvenga preferenzialmente mediante SDC1 (31).

Il meccanismo mediante il quale apoC-III influenza la *clearance* epatica recettore mediata delle TRLs non è al momento chiarito in modo definitivo. Una possibile spiegazione è che apoC-III prevenga l'eliminazione delle TRL mediata da LDLR e LRP1 indebolendo l'associazione tra apoE e TRL (31, 34-36). Infatti, l'apoE presente sulle TRL è un ligando critico per l'eliminazione epatica delle TRL in quanto media il legame con SDC1, LDLR e LRP1 (33). Tuttavia, l'ipotesi che questi effetti siano legati ad uno spiazzamento di apoE è stata messa in discussione, così che non è ancora certo il modo in cui apoC-III blocca il legame delle TRL a LDLR e LRP1 (21).

Un altro ruolo importante di apoC-III è quello legato al fatto che questa apolipoproteina 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) (38, 39). La sovraespressione 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* (39). 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 insu-

linica, si è osservata un'umentata 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'umentata produzione di VLDL-apoC-III (40-42).

ApoC-III e infiammazione

Nel tentativo di comprendere meglio l'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 β 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 (43). Altri studi hanno dimostrato come apoC-III induca l'espressione di molecole di adesione sull'endotelio così facilitando il reclutamento dei leucociti. Inoltre, in topi ipercolesterolemici difettivi per LDLR (*ldlr*^{-/-}), la somministrazione di apoC-III umana si associa ad aumento dell'apoC-III nelle placche ateromasiche e ad un incremento della transmigrazione leucocitaria (44, 45). In un recente studio, Lu Dai et al. (46) hanno dimostrato come apoC-III promuova in modo significativo l'espressione TNF- α -indotta di JAM-1 nelle cellule endoteliali umane (HUVECs) attraverso la via del PI3K-IKK2-p65 pathway. JAM-1 gioca un ruolo essenziale nel processo di adesione delle piastrine nelle cellule endoteliali infiammate, processo che promuove la formazione di placche e aterosclerosi. Il silenziamento della via PI3K-IKK2-p65 sopprime il ruolo aterogenico di apoC-III inibendo l'espressione di JAM-1 (46).

ApoC-III e diabete

La concentrazione di apoC-III è elevata nei soggetti con diabete come a suggerire una possibile correlazione positiva con l'alterazione del metabolismo dei carboidrati. L'apoCIII aumenta l'apoptosi della β -cellula pancreatica attraverso un aumento dei livelli di Ca^{2+} citoplasmatici nelle cellule che producono insulina. In aggiunta a questo dato, l'iper-espressione di apoCIII aumenta la steatosi epatica non alcolica e esacerba i *pathway* infiammatori a livello del muscolo scheletrico, alterando il segnale insulinico inducendo così insulino-resistenza. Recenti studi hanno inoltre rilevato un possibile meccanismo di aumento del peso corporeo e produzione di glucosio mediata da una potenziale inibizione di LPL apoC-III-indotta a livello dell'ipotalamo. Altri studi hanno dimostrato come la presenza di apoC-III sulla superficie delle lipoproteine ad alta densità (HDL) determini una alterazione delle loro proprietà anti-glicemiche e ateroprotettive. Tutti questi dati supportano l'ipotesi che la modulazione di apoC-III possa rappresentare non solo una cura per l'ipertrigliceridemia, ma determinare anche un miglioramento del metabolismo dei carboidrati (47).

La lezione imparata dalle varianti di APOCIII

Importanti progressi nella comprensione del ruolo funzionale dell'apoC-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.

Negli anni, molti polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) in APOC3 sono stati associati ad effetti nel metabolismo dei trigliceridi e nel rischio cardiovasco-

lare (48-51). Mediante tecniche di whole-genome sequencing è stata recentemente identificata una rara mutazione con perdita di funzione (rs138326449) negli South Dakota Hutterites, una popolazione fondatrice di discendenza Europea. Questa mutazione si associa a bassi livelli di trigliceridi, bassi livelli di HDL e ridotto rischio cardiovascolare (52). Studi epidemiologici successivi hanno dimostrato che verosimilmente questo effetto non è mediato unicamente dall'impatto di apoC-III sull'attività di LPL ma, come precedentemente accennato, da un meccanismo indipendente dalla lipoprotein lipasi (53). Una recente metanalisi ha raggruppato i dati provenienti da 29 studi, per esplorare una correlazione tra rischio cardiovascolare e i 3 SNPs di APOC3 più comunemente associati ad ipertrigliceridemia (SstI, C-482T, e T-455C). Precedenti studi hanno dimostrato come i portatori del polimorfismo SstI avrebbero più alti livelli di apoC-III e trigliceridi (54), mentre gli omozigoti per le varianti C-482T, e T-455C sarebbero resistenti alla regolazione (down-regulation) insulino-mediata della trascrizione del gene APOC3 con conseguente aumento della trigliceridemia (55). In questa metanalisi (53), un significativo aumento del rischio cardiovascolare è stato osservato nei soggetti portatori del polimorfismo SstI (S2 vs S1: odds ratio (OR)=1,30, 95% confidence interval (CI) 1,10-1,55). Dati simili sono stati confermati anche per i soggetti portatori del polimorfismo T-455C (C versus T: OR =1,28, 95% CI 1,16-1,41) mentre nessuna associazione è stata osservata tra C-482T e malattia cardiovascolare.

Nello studio prospettico caso-controllo European Prospective Investigation of Cancer (EPIC)-Norfolk erano stati misurati i valori basali di apoC-III plasmatico. Questi dati sono stati recentemente analizzati per confermare la correlazione tra apoC-III e

malattia cardiovascolare nonché per identificare le frazioni lipoproteiche responsabili di questa correlazione (56). Dei 2711 partecipanti allo studio, 823 hanno sviluppato malattia cardiovascolare e questa era correlata in modo positivo ai livelli di apoC-III (odds ratio di 1,47 aggiustato per fattori di rischio cardiovascolari). L'apoC-III era rispettivamente positivamente correlata ai livelli di TG ($r=0,39$), alle VLDL ($r=0,25$), IDL ($r=0,23$), alle LDL piccole e dense ($r=0,26$), e *high-sensitivity* proteina C reattiva (hsCRP) ($r=0,15$) ed inversamente con le particelle LDL ($r=-0,11$), $p<0,001$ (51).

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.

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 (57). 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 (58). Questi effetti sono stati attribuiti ad una ridotta capacità della apoC-III mutante di legare lipidi, un difetto che poteva indurne un accelerato catabolismo intracellulare (58). Studi funzionali condotti in vitro su cellule epatiche esprimevano 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 (59, 60) 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-III₆ (61). Viceversa, nel caso della mutazione Gln38Lys, i portatori eterozigoti di questa mutazione presentavano livelli plasmatici di TG del 30% più elevati rispetto ai familiari non portatori (62). 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

Diversi studi di sequenziamento su popolazioni diverse hanno ormai dimostrato con convinzione l'associazione tra le mutazioni con perdita di funzione di *APOC3* e la protezione dalla malattia coronarica (CHD) (9, 10, 63). In questi studi i livelli plasmatici dei trigliceridi e i tassi di CHD erano di circa il ~40% più bassi nei soggetti eterozigoti per mutazioni in *APOC3* rispetto ai soggetti non portatori. L'associazione tra bassi livelli di trigliceridi e protezione verso la CHD nei soggetti eterozigoti *APOC3* è consistente con l'ipotesi che le TRL siano aterogeniche; nonostante ciò apoC-III ha effetti pleiotropici sul metabo-

lismo lipidico e potrebbe agire attraverso diversi meccanismi (64). Alcune evidenze mostrano che *APOC3* potrebbe essere implicata direttamente nel promuovere aterosclerosi (65). Altri dati sembrerebbero invece dimostrare come mutazioni in *APOC3* riducono i livelli di LDL, migliorano la *clearance* di *remnant* circolanti delle lipoproteine e aumentato i livelli di HDL (64). 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 osservando come queste mutazioni fossero associate a una riduzione nella colesterolemia LDL tanto importante da poter spiegare l'effetto cardioprotettivo (9, 10). In un editoriale di commento a questi due studi, H. Hobbs e J. Cohen (Dallas USA) (66) hanno posto l'accento sull'effetto pleiotropico sulle diverse frazioni lipoproteiche legato al deficit genetico di *APOC3*. In particolare, essi hanno rimarcato il fatto che in entrambi gli studi di randomizzazione Mendeliana, sia pure in misura diversa, i portatori di mutazioni LOF di apoC-III presentavano ridotti livelli di LDL-C. I portatori di mutazioni in *APOC3* nella coorte di Kathiresan et al. (10) avevano una riduzione della colesterolemia LDL del 16% mentre nello studio di Tybjaerg-Hansen et al. (9) la riduzione media di LDL-C era solo del 3% più bassa nei *carriers* di mutazioni in *APOC3* rispetto ai non-*carriers*. Questa modesta riduzione tuttavia, difficilmente è in grado di spiegare la drammatica riduzione di CHD nei soggetti con varianti in *APOC3*. Secondo gli autori un fattore che potrebbe mascherare il contributo effettivo dei livelli di LDL-C nel determinare CHD nei soggetti con mutazioni in *APOC3*, è la terapia con statine. Le statine sono ovviamente maggiormente prescritte nei soggetti con

più alti livelli di colesterolo LDL, fattori di rischio cardiovascolari o pregressa CHD. Se i soggetti con mutazioni di *APOC3* avessero più alti livelli di LDL-C sarebbero dunque maggiormente trattati con statine andando così ad oscurare le differenze nei livelli di LDL-C tra *carriers* e *non carriers* (66). Gli autori ipotizzano che, considerati i fattori di confondimento legati a questi due lavori di randomizzazione Mendeliana (in modo particolare, la terapia con statine), questa riduzione di LDL-C potrebbe essere responsabile degli effetti benefici sul rischio cardio-vascolare del deficit di apoC-III (66). Nonostante questi dati possano apparire convincenti, la recente osservazione che i soggetti con completo deficit di *APOC3* abbiano livelli normali di LDL-C rende questo modello meno plausibile (67). Inoltre, sempre con maggiore forza negli ultimi anni sta nascendo il concetto del colesterolo *remnant* (definito come il contenuto del colesterolo nelle TRL). Secondo queste recenti evidenze, l'ipotesi biologicamente plausibile per la riduzione della malattia cardiovascolare negli studi genetici sopra-menzionati potrebbe essere legata al fatto che la bassa concentrazione di trigliceridi sarebbe un marcatore dei bassi livelli di colesterolo *remnant* (in particolare quello contenuto nelle lipoproteine a densità intermedia (IDL), VLDL nel digiuno e chilomicroni *remnant* nella fase post-prandiale). Rispetto ai trigliceridi *per sé* sarebbe proprio questo colesterolo *remnant* ad essere direttamente implicato nei processi sia di formazione che di infiammazione della placca aterosclerotica (68, 69). A conferma di questo dato, recenti studi di randomizzazione Mendeliana hanno dimostrato come elevati livelli di colesterolo *remnant* siano associati ad un aumentato rischio di malattia cardiovascolari e mortalità suggerendo un nesso causale diretto (68-74).

Wulff AB et al. (75) hanno condotto una metanalisi su 137.895 individui testando se la riduzione della malattia cardiovascolare nei soggetti eterozigoti per mutazioni determinanti perdita di funzione (LOF) in *APOC3* fosse mediata da bassi livelli di colesterolo *remnant* e LDL. Nella metanalisi, il colesterolo *remnant* e LDL erano rispettivamente del 43% (95% IC, 40%-47%) e 4% (1%-6%) più bassi nei soggetti eterozigoti (n=776) per mutazioni con perdita di funzione rispetto i *non-carriers*. Il colesterolo *remnant* mediava il 37% dell'osservato 41% minore rischio di malattia cardiovascolare e il 54% dell'osservato 36% minore rischio di malattia coronarica, mentre i valori corrispondenti per il colesterolo LDL erano rispettivamente l'1% e 2% (75). In conclusione, tutti questi dati provenienti da studi di sequenziamento su popolazioni o di randomizzazione mendeliana sembrerebbero, dunque, andare a confutare l'ipotesi che la riduzione della CHD nei *carrier* di mutazioni LOF in *APOC3* sia mediata dalla riduzione di LDL-C andando a supportare l'ipotesi che questi effetti siano legati alla riduzione del colesterolo *remnant*.

ApoCIII come bersaglio terapeutico nell'ipertrigliceridemia severa

Elevati livelli di trigliceridi si associano ad un aumentato rischio di pancreatite. Nonostante non vi sia ancora un consenso relativamente la definizione dei diversi gradi di ipertrigliceridemia, si definiscono come affetti da ipertrigliceridemia severa i soggetti con trigliceridi >1.000 mg/dl (76). Le attuali opzioni terapeutiche per la cura dell'ipertrigliceridemia includono la riduzione del peso (5-20% per ottenere una riduzione della concentrazione dei trigliceridi del 20%), la dieta (inclusa l'abolizione degli alcolici) (10-15% di riduzione), l'attività fisica (15-20%), i fibrati (30-50%), acidi

grassi omega 3 (20-50%), statine (10-30%) ed ezetimibe (10%) (76). Nonostante ciò, gli individui con ipertrigliceridemia severa frequentemente non riescono a raggiungere valori ottimali di trigliceridemia a digiuno con persistente rischio di andare incontro a pancreatite acuta (76).

Terapie "convenzionali" che modulano i livelli plasmatici di apoC-III

ApoC-III è un target terapeutico di diversi farmaci usati per ridurre i livelli di trigliceridi (77). I fibrati, attraverso l'attivazione di specifici recettori nucleari (PPAR α) inibiscono la trascrizione dell'mRNA di apoC-III riducendone i livelli circolanti e contribuendo alla riduzione della trigliceridemia osservata con questi farmaci. In aggiunta, il Tasagliptazar (un dual PPAR α and PPAR γ agonista) e il pioglitazone (un PPAR γ agonista) riducono i livelli di apoC-III e trigliceridi (TG) circolanti e migliorano l'insulino-resistenza. Gli esteri etilici degli omega 3 riducono i livelli plasmatici di TG determinando una riduzione della malattia cardiovascolare. Similmente a questo, l'atorvastatina e la rosuvastatina riducono la produzione ed aumentano il catabolismo delle VLDL e apoC-III, meccanismo che spiega la riduzione della concentrazione di trigliceridi che si osserva nei pazienti con sindrome metabolica o diabete trattati con questi farmaci. Comunque, tutte queste strategie farmacologiche riescono a determinare una riduzione della trigliceridemia che si aggira tra il 10-30%. Una maggiore riduzione dell'apoC-III si potrebbe probabilmente associare a benefici addizionali simili a quelli osservati nei pazienti con mutazioni genetiche che determinano una riduzione dei livelli di apoC-III del 50% rispetto ai controlli. Per queste ragioni, la cura del-

la ipertrigliceridemia, in particolare nella sua forma severa, rappresenta un bisogno clinico che, al momento, risulta ancora insoddisfatto. Sono necessari nuovi farmaci che aiutino a ridurre i trigliceridi in modo efficace e sicuro. Nei paragrafi precedenti abbiamo ampiamente discusso come l'apoC-III, glicoproteina sintetizzata prevalentemente a livello epatico, abbia un ruolo centrale nell'inibire il catabolismo dei trigliceridi ed aumentarne la secrezione epatica. Considerato il ruolo di apoC-III come regolatore del metabolismo dei trigliceridi e potenzialmente del rischio cardiovascolare, sono in via di sperimentazione nuove tecnologie farmacologiche volte ad inibire apoC-III.

L'inibizione diretta di apoC-III mRNA per ridurre i livelli di apoC-III circolante

L'uso di anticorpi anti apoC-III sarebbe problematico a causa delle elevate concentrazioni plasmatiche di apoC-III (10-20 mg/dL) (77). Gli oligonucleotidi antisenso (ASO) sono una classe di RNA terapeutici disegnati per legarsi selettivamente all'mRNA di una proteina specifica. Dopo il legame con l'mRNA selezionato, l'ASO induce la degradazione dell'RNA attraverso la ribonucleasi ubiquitaria RNasiH1, determinando, così, una riduzione della sua produzione e, dunque, dei livelli plasmatici (*Figura 2*) (77-81). Questi approcci di silenziamento dei geni rappresentano al momento le strategie tecnologiche emergenti per la gestione della dislipidemia e l'ISIS APOCIIIrx (ISIS 304801), un ASO di seconda generazione modificato con -O-(2-methoxyethyl) (20-MOE), è stato disegnato proprio per ridurre la sintesi epatica di apoC-III determinando una caduta dei suoi livelli circolanti (*Tabella 1*) (77).

I risultati del trial di Fase I

Il primo studio sull'uomo è stato quello pubblicato da Graham et al. (82) che consisteva in uno studio di fase 1 in doppio cieco, controllato *vs* placebo, con dosi crescenti di ISIS 304801 (volanesorsen) somministrato ad adulti volontari sani normotrigliceridemici (N=33, 25 hanno ricevuto ISIS 304801 e 8 placebo). La somministrazione di ISIS 304801 ha determinato una riduzione prolungata e dose dipendente della apoC-III circolante e dei livelli di trigliceridi. Nello specifico, i soggetti sono stati trattati con 6 diverse dosi di farmaco o placebo nei 22 giorni di studio; le dosi erano 50, 100, 200 o 400 mg. Le percentuali di riduzione della concentrazione di apoC-III rispetto al basale una settimana dopo l'ultima dose (giorno 29)

erano rispettivamente del 19,7%, 17,3%, 70,5% e 78,0% per le dosi di 50, 100, 200 o 400 mg. Le riduzioni corrispondenti dei livelli di trigliceridemia erano del 19,5%, 25,0%, 43,1% e 43,8%, rispettivamente (82). La riduzione osservata sia di apoC-III che della trigliceridemia si manteneva anche a 4 settimane dall'ultima dose per i dosaggi di farmaco maggiori (100, 200 e 400 mg). Questo effetto era spiegato dalla lunga emivita del farmaco (11,7 e 31,2 giorni). Non si sono osservate variazioni significative delle altre frazioni lipoproteiche se non per un trend in aumento (non dose dipendente) della colesterolemia HDL. Lo studio ha evidenziato come l'eliminazione del farmaco sia legata prevalentemente all'eliminazione renale dei suoi metaboliti. Nello studio di fase 1, ISIS 308401 si è dimostrato ben tollerato; infatti, non si sono

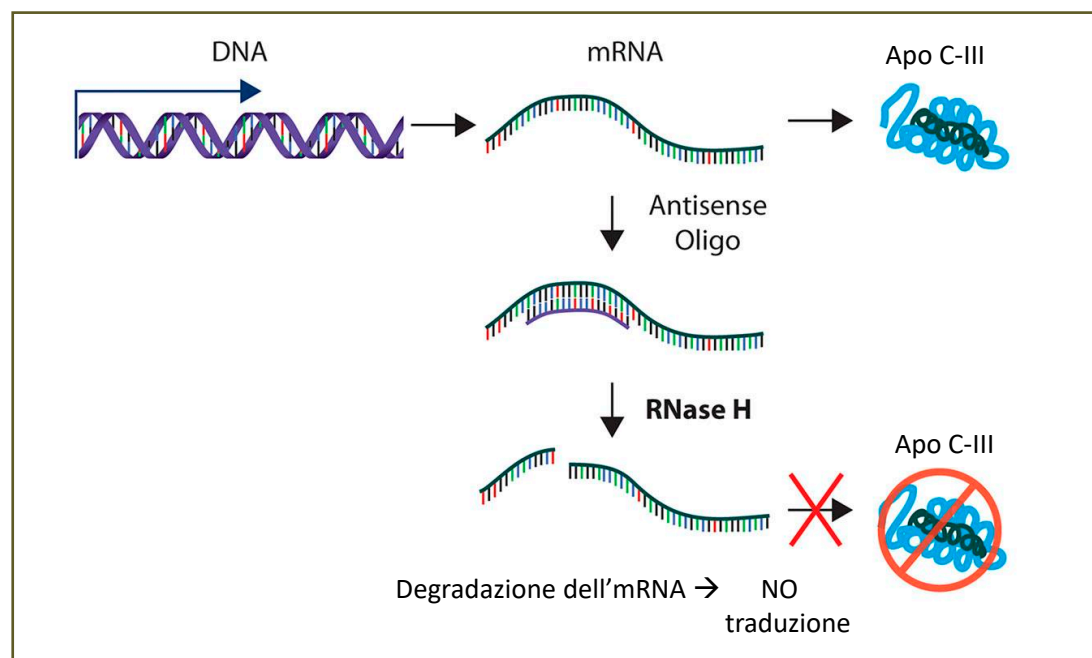


Figura I - La tecnologia degli oligonucleotidi anti-senso.

Gli oligonucleotidi anti-senso (ASO) sono una classe di RNA terapeutici disegnati per legarsi selettivamente all'mRNA di una proteina specifica. Dopo il legame con l'mRNA selezionato, l'ASO induce la degradazione dell'RNA attraverso la ribonucleasi ubiquitaria RNasiH1, determinando, così, una riduzione della sua produzione e, dunque, dei livelli plasmatici [77-81].

Tabella I - Principali studi che hanno valutato l'efficacia del Volanesorsen.

Ref.	Fase	Patologia	N.	Durata (sett.)	Risultati
1)	1	Volontari sani	3	-	Riduzione dose-dipendente prolungata dei livelli di apoC-III e trigliceridi
2)	2	DT2 in scarso controllo (Hba1c>7,5%) e TG a digiuno > 200 mg/dl e <500 mg/dL	15	15	Riduzione dell'apoC-III (-88%, P = 0.02) e dei TG (-69%, P = 0.02) ed aumento dell'HDL (HDL-C) (42%, P = 0.03) vs placebo Miglioramento del 57% della sensibilità insulinica (P < 0.001)
3)	2	TG ≥350 e ≤2000 mg/dL nonostante terapia con fibrato	57	13	Riduzione prolungata e dose dipendente dei livelli di ApoC-III (40.0±32.0% nel Gruppo a 100 mg, 63.8±22.3% nel Gruppo a 200 mg, e 79.6±9.3% nel Gruppo a 300 mg vs. un aumento di 4.2±41.7% nel Gruppo placebo se somministrato singolo; ridotto del 60.2±12.5% nel Gruppo a 200 mg e 70.9±13.0% a 300 mg, vs. una riduzione del 2.2±25.2% nel Gruppo a placebo se somministrato in aggiunta al fibrato). Riduzione concordante dal 31,3 al 70,9% dei livelli di trigliceridi.
4)	2	FCS	3	13	Riduzione dei livelli di ApoC-III tra 71 e 90% e dei trigliceridi dal 56 all'86%
5) e 6)	3	FCS e TG a digiuno > 750 mg/dl	67	57	I pazienti con più di 2 episodi di pancreatite nei 5 anni precedenti non hanno presentato episodi di pancreatite (p=0.02). La riduzione dei trigliceridi in 3 mesi è stata del 77% nel Gruppo con VLN 18% nel Gruppo con placebo (p,0.0001).
6) e 7)	3	TG a digiuno > 500 mg/dl	114	26	Dopo 3 mesi di terapia il VLN ha ridotto i trigliceridi del 73% (p,0.0001) (n=75) vs il 2% nel Gruppo trattato con placebo (n=38)

Referenze della tabella:

- 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.
- Digenio A, Dunbar RL, Alexander VJ, Hompesch M, Morrow L, Lee RG, Graham MJ, Hughes SG, Yu R, Singleton W, Baker BF, Bhanot S, Crooke RM. Antisense-Mediated Lowering of Plasma Apolipoprotein C-III by Volanesorsen Improves Dyslipidemia and Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2016 Aug;39(8):1408-15.
- 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; 371:2200-6.
- 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; 371:2200-6
Gaudet D, Alexander VJ, Baker BF, Brisson D, Tremblay K, Singleton W, Geary RS, Hughes SG, Viney NJ, Graham MJ, Crooke RM, Witztum JL, Brunzell JD, Kastelein JJ. Antisense Inhibition of Apolipoprotein C-III in Patients with Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med.* 2015 Jul 30;373(5):438-47.
- Gaudet D, Digenio A, Alexander VJ, et al. The APPROACH study: a randomized double-blind placebo-controlled, phase 3 study of volanesorsen administered subcutaneously to patients with FCS. *Athero Suppl.* 2017; 263:e10.
- Gelrud A, Digenio A, Alexander VJ, Williams KR, Hsieh A, Gouni-Berthold I, Bruckert E, Stroes E, Geary R, Hughes S, Tsimikas S, Gaudet D. Treatment with volanesorsen (VLN) reduced triglycerides and pancreatitis in patients with FCS and sHTG vs placebo: results of the APPROACH and COMPASS Studies. *Athero Suppl.* 2018; 32:157.
- Gouni-Berthold I, Alexander V, Digenio A, DuFour R, Steinhagen-Thiessen E, Martin S, Moriarty P, Hughes S, Gaudet D, Stroes E, Baass A. Apolipoprotein C-III Inhibition with volanesorsen in patients with hypertriglyceridemia (COMPASS): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Athero Suppl.* 2017; 28:e1-e2.

avuti eventi avversi seri (SAE) o interruzioni anticipate del *trial* dovute ad effetti collaterali avversi (AE). Gli effetti collaterali più comuni sono state le reazioni nel sito di iniezione, che si sono osservate in circa il 53% dei partecipanti. Un aumento transitorio della proteina C reattiva (PCR) è stato osservato nel 28% dei soggetti trattati con ISIS 304801. Tale effetto era dose dipendente e, in questa fase, non era associato ad alcun sintomo sistemico.

I risultati dei trial di Fase 2

Considerati i risultati del trial di fase 1, Gaudet et al. (83), hanno deciso di esaminare gli effetti della inibizione di APOC3 mediante ISIS 304801 nei pazienti con Sindrome Chilomicronemica Familiare (FCS). L'FCS è una patologia ultra-rara a trasmissione autosomica recessiva dovuta a mutazioni nei geni codificanti per la LPL o i geni che ne modulano il funzionamento (84). I pazienti affetti da FCS presentano livelli molto alti di chilomicroni circolanti, ipertrigliceridemia severa (>1.000 mg/dl) e, come complicanza, episodi ricorrenti di dolori addominali gravi e pancreatite acuta (85). La sindrome è associata anche ad una serie di altre manifestazioni quali xantomi eruttivi, artralgie, sintomi neurologici, lipemia retinalis ed epatosplenomegalia (87). Gli episodi ricorrenti di pancreatite acuta generalmente comportano lo sviluppo di pancreatite cronica con la comparsa di sintomi di insufficienza pancreatica esocrina ed endocrina (diabete) (83). Al momento attuale, non vi sono molte opzioni terapeutiche in quanto le attuali strategie farmacologiche non sono adeguatamente efficaci e la terapia dietetica prescritta con basso contenuto in grassi (<20 gr/die; <15% delle calorie totali) sono impossibili da mantenere a lungo termine (87). Nel 2012, la European Medicines Agency

(EMA) ha approvato alipogene tiparvovec (Glybera), una terapia genica di *LPL gene-replacement* (88), per il trattamento della FCS. Nonostante ciò, a causa degli elevati costi di produzione ed al numero piuttosto esiguo di pazienti candidabili al trattamento (solo pazienti con massa LPL dosabile <5%), l'azienda produttrice ha deciso di interrompere la produzione e commercializzazione del farmaco che dal 2017 non è più disponibile (89).

Nello studio in aperto di Fase 2, sono stati seguiti i tre pazienti con FCS, attività LPL <5% del normale e trigliceridi tra 1.406 e 2.083 mg/dL. Il paziente 1, un uomo di 45 anni, e il paziente 3, una donna di 28 anni, erano entrambi omozigoti per una mutazione *null* nel gene *LPL*. La paziente 2, una donna di 67 anni, era una eterozigote composta per mutazioni *null* nel gene *LPL*. Tutti e tre i pazienti arruolati nello studio erano aderenti ad uno stretto regime dietetico in accordo con le linee guida (90). Dopo 13 settimane di trattamento con ISIS 304801, a dosaggio di 300 mg SC, i livelli di apoC-III si sono ridotti tra il 71-90% e i trigliceridi tra il 56-86%. Tutti e tre i pazienti hanno raggiunto valori di trigliceridi <500 mg/dL in corso di terapia e risultati simili sono stati ottenuti anche con i chilomicroni, apolipoproteina B-48 (apoB-48) e il non-HDL-C. In 2 dei 3 pazienti è stato eseguito anche uno studio post-prandiale con un pasto liquido standard prima e dopo la terapia, dimostrando una marcata riduzione sia della trigliceridemia totale sia dei chilomicroni. L'attività della LPL si è mantenuta <5%, supportando ulteriormente l'ipotesi che l'apoC-III agisca regolando i trigliceridi attraverso una via LPL-indipendente. Anche nello studio di Fase 2, i più frequenti effetti collaterali sono state le reazioni nel sito d'iniezione. Il paziente 1, che aveva una storia di pancreatiti ricorrenti, ha presentato

un episodio di pancreatite acuta durante il follow-up, 1 mese dopo l'ultima iniezione del farmaco sperimentale (probabilmente legato anche ad una scarsa aderenza alla dietoterapia ed all'abolizione del consumo di alcolici). Il paziente 3 ha avuto 5 episodi di diarrea lieve che sono stati giudicati come relati o possibilmente relati alla terapia farmacologica.

In un ulteriore studio sono stati invece esaminati gli effetti di ISIS 304801 in una coorte di pazienti con ipertrigliceridemia (91). Questo era uno studio randomizzato, controllato *vs* placebo, in doppio cieco di Fase 2 in cui si valutavano gli effetti di ISIS 304801 in un gruppo di pazienti non trattati con livelli di trigliceridi a digiuno compresi tra 350 mg/dL e 2.000 mg/dL (coorte in monoterapia), e in un altro gruppo di pazienti trattati in modo stabile con fibrati e con livelli di trigliceridi a digiuno tra 225 mg/dL e 2.000 mg/dL (*add-on* coorte). I pazienti sono stati randomizzati a terapia con ISIS 304801, a dosi tra 100 e 300 mg (nella coorte in *add-on* sono stati usati i dosaggi di 200 e 300 mg) o placebo, 1 volta a settimana ogni 13 settimane. L'obiettivo primario era la riduzione percentuale di apoC-III rispetto al basale. Nella coorte in monoterapia, dei 57 pazienti trattati con ISIS 30480, 41 hanno ricevuto ISIS 304801 e 16 placebo, mentre nella coorte *add-on* 20 pazienti hanno ricevuto ISIS 30480 e 8 placebo. I valori di trigliceridi basale nelle coorti in monoterapia e *add-on* erano rispettivamente 581 mg/dl e 376 mg/dl. Il trattamento con ISIS 304801 ha determinato una prolungata, dose-dipendente riduzione dei livelli di apoC-III plasmatica sia quando il farmaco è stato somministrato come singolo agente (riduzione del 40,0%, 63,8%, 79,6% nei gruppi trattati rispettivamente con 100 mg, 200 mg e 300 mg e un aumento del 4,2% nel gruppo con placebo) che quando in farmaco è stato

somministrato in aggiunta alla terapia con fibrati (riduzione dei livelli di apoC-III del 60,2% e 70,9% nei gruppi trattati con 200 e 300 mg e solo del 2,2% nel gruppo trattato con placebo). Una parallela riduzione si è osservata anche a carico della trigliceridemia che si è ridotta tra il 31,3 e il 70,9%. Le reazioni nel sito d'iniezione si sono osservate nel 13% delle iniezioni nei pazienti in terapia con ISIS 304801, del 15% delle iniezioni nella coorte in *add-on* e nello 0% nel gruppo in placebo. Le reazioni nel sito di iniezione, riferite come dolore o eritema lieve, generalmente non erano progressive e si sono risolte spontaneamente. Il 10% dei soggetti trattati con il farmaco sperimentale hanno interrotto il trattamento a causa degli AE (nessuna correlazione tra l'interruzione e il dosaggio del farmaco). In un caso si è osservato un evento avverso serio caratterizzato dalla comparsa di sindrome da siero che è comparsa 3 giorni dopo l'undicesima dose settimanale di 200 mg di ISIS 304801 nella coorte in *add-on*. La biopsia cutanea, il pannello per vasculite, l'autoimmunità come anche gli anticorpi contro il farmaco sperimentale e la PCR, sono stati tutti misurati mostrando risultati negativi. Nella coorte in *add-on* sono stati osservati altri quattro eventi avversi seri occorsi tutti in un unico paziente in trattamento con 300 mg di ISIS 304801 e caratterizzati dalla stenosi di un *graft* arterioso. Gli altri effetti collaterali riportati sono stati: astenia (8,3%), dolori muscolari (9,8%), nausea (9,8%), brividi (7,3%) e mialgie (7,3%).

Digenio et al. (92) hanno condotto uno studio randomizzato, controllato *vs* placebo, in doppio cieco, nei pazienti (N=15) con diabete mellito di tipo 2 ed ipertrigliceridemia (definita come valori di trigliceridi tra 200 e 500 mg/dL). I pazienti sono stati randomizzati 2:1 con volanesorsen 300 mg SC una volta a settimana o place-

bo. In questi pazienti è stato condotto un clamp euglicemico-iperinsulinemico al fine di esaminare la secrezione insulinica e l'insulino-sensibilità prima e dopo trattamento con il farmaco sperimentale. In questo studio la terapia con Volanesorsen ha ridotto dell'88% dei livelli di apoC-III e del 69% dei trigliceridi. L'HDL è aumentato del 43%. Il trattamento con Volanesorsen si è associato ad un miglioramento del 57% della sensibilità insulinica e del controllo glicemico (valutato come riduzione della emoglobina glicosilata e della fruttosamina una settimana dopo l'ultima dose di farmaco).

I trial di fase 3

Gli studi di fase 3 sono lo studio APPROACH (uno studio sull'utilizzo di ISIS 304801 su una coorte di pazienti con Sindrome Chilomicronemica Familiare NCT02211209) e lo studio COMPASS (uno studio con ISIS APOC-IIIRx nei pazienti con ipertrigliceridemia NCT02300233). Questi studi sono volti a testare l'ipotesi che la terapia con Volanesorsen, rispetto a placebo, riduca i livelli di trigliceridi rispettivamente nei pazienti con FCS o ipertrigliceridemia.

Lo studio APPROACH (93-94) è uno studio multicentrico, randomizzato, controllato con placebo, in doppio cieco, in pazienti con FCS e trigliceridi >750 mg/dl con randomizzazione 1:1 a terapia con Volanesorsen 300 mg SC una volta a settimana o placebo per una durata complessiva di 52 settimane (arruolamento completato con 67 pazienti). L'obiettivo primario di questo studio era quello di valutare l'efficacia della terapia con Volanesorsen rispetto a placebo nel ridurre la trigliceridemia a digiuno dopo 3 mesi di terapia (*primary analysis time point*) (77). Alla fine dello studio i pazienti potevano entrare nello studio in

aperto (open-label o OLE) oppure, coloro che non partecipavano alla fase OLE, venivano inclusi in un periodo di valutazione post-trattamento di 13 settimane. Alcune informazioni sui pazienti inclusi nello studio APPROACH sono state recentemente pubblicate da un gruppo di ricercatori. I dati presentati in questo lavoro hanno dimostrato come non vi siano differenze sostanziali del fenotipo tra i pazienti LPL FCS e i non-LPL FCS (portatori di varianti in omozigosi nei geni causali non FCS) e che i soggetti LPL FCS hanno minore attività LPL post-eparina e livelli di trigliceridi lievemente maggiori, mentre i non-LPL FCS avrebbero più alti livelli di colesterolo LDL (95). Lo studio COMPASS (96-97) è uno studio multicentrico della durata di 26 settimane, doppio cieco, controllato con placebo che ha incluso pazienti con trigliceridemia a digiuno >500 mg/dl. I pazienti sono stati randomizzati 2:1 a ricevere 300 mg di Volanesorsen SC una volta a settimana o placebo per 26 settimane (arruolamento completato con 114 pazienti).

I risultati degli studi COMPASS e APPROACH sono stati recentemente combinati mostrando come la riduzione osservata della trigliceridemia si sia tradotta in una significativa riduzione del tasso di pancreatite acuta (1 evento in un paziente trattato con Volanesorsen *vs* 9 eventi in 6 pazienti trattati con placebo $p=0,0185$) (98). Nello studio APPROACH, la riduzione percentuale media dei trigliceridi dopo 3 mesi dall'inizio della terapia è stata del 77% rispetto al basale nel gruppo trattato con Volanesorsen ($n=33$), mentre nel gruppo in trattamento con placebo si è osservato un aumento della trigliceridemia del 18% ($n=33$), $p=0,0001$. Questa significativa riduzione della trigliceridemia si è tradotta nel fatto che il gruppo di pazienti che presentavano in anamnesi più di 2 episodi di pancreatite nei 5 anni precedenti

l'arruolamento, non abbiano presentato alcun evento durante tutta la durata dello studio APPROACH ($p=0,02$). Nello studio COMPASS la riduzione della trigliceridemia dopo 3 mesi di terapia, è stata del 73% e del 2% rispettivamente nel gruppo trattato con Volanesorsen e placebo.

I più comuni effetti collaterali riportati nei pazienti trattati con il farmaco sperimentale sono state le reazioni nel sito d'iniezione. Un effetto collaterale particolarmente sorprendente nello studio APPROACH è stata la riduzione dei livelli di piastrine che ha determinato la necessità di interrompere il trattamento in 5 pazienti (in 2 dei quali la conta delle piastrine si è ridotta $<25.000/ml$). Questo effetto collaterale è prontamente regredito dopo l'interruzione della terapia farmacologica. Diversamente da quanto osservato nello studio APPROACH, nello studio COMPASS non si è osservato alcun evento avverso serio legato alla riduzione delle piastrine ma un solo evento interpretato come "malattia da siero" che sarebbe occorso 2 settimane dopo l'ultima dose di farmaco. Le ragioni per le quali si sono osservati questi effetti collaterali, in particolare la riduzione marcata delle piastrine nei pazienti FCS arruolati nello studio APPROACH, sono attualmente oggetto di discussione.

Recentemente sono stati pubblicati i dati dello studio ReFOCUS (99). Quest'ultimo è uno studio retrospettivo globale basato su un registro web dei pazienti con FCS che sono stati trattati per almeno 3 mesi con Volanesorsen nella fase OLE. Questo registro includeva informazioni relative alle condizioni cliniche dei pazienti prima e dopo il trattamento con Volanesorsen. I 22 pazienti che hanno risposto al questionario, hanno ricevuto il farmaco per una mediana di 222 giorni. La terapia con Volanesorsen ha significativamente ridotto la quantità di sintomi riferiti dal

paziente dal punto di vista fisico, emotivo come anche della capacità di svolgere attività fisica. I pazienti hanno riferito una significativa riduzione della steatorrea, del dolore pancreatico e della componente emozionale legata alla costante paura delle complicanze pancreatiche legate ad FCS. Tutti questi dati hanno portato ad un miglioramento dell'impatto della malattia sulle loro attività scolastiche o lavorative con miglioramento della qualità della vita.

Un altro studio multicentrico, randomizzato, controllato con placebo, in doppio cieco, di fase 2/3 con Volanesorsen è lo studio BROADEN nei pazienti con lipodistrofia (100). L'obiettivo primario di questo studio è stato valutare l'efficacia e la sicurezza della terapia con Volanesorsen rispetto a placebo nel ridurre i trigliceridi rispetto al basale dopo 3 mesi di terapia farmacologica, somministrato in una coorte di pazienti con *Familial Partial Lipodystrophy* che frequentemente si associa a ipertrigliceridemia moderata (101) ed elevati livelli di apoC-III (102). Lo studio aveva la durata di 52 settimane, ha coinvolto 60 pazienti randomizzati con rapporto 1:1 ed ha previsto una fase in OLE di 104 settimane (NCT02639286). I pazienti non entrati nella fase di OLE sono stati seguiti per le successive 13 settimane.

Stato dell'arte relativo all'autorizzazione del Volanesorsen

Il 24 agosto 2018 la US Food and Drug Administration (FDA) ha annunciato di non approvare il Volanesorsen per il trattamento dei pazienti con FCS; questa decisione ha scatenato un grande dibattito in quanto l'FCS rimane, al momento, una malattia orfana grave ed invalidante. Diversamente da quanto deciso dalla FDA, il 28 febbraio 2019 il Comitato per i Medicinali per Uso Umano (CHMP) dell'Agenzia Europea del

Farmaco (EMA) ha raccomandato l'autorizzazione all'immissione in commercio condizionata di Volanesorsen per i pazienti con FCS geneticamente confermata e ad alto rischio di pancreatite, nei quali la risposta alla dieta e alla terapia di riduzione dei trigliceridi si è rivelata inadeguata.

Prospettive future: ASO anti apoC-III di terza generazione

Considerati gli effetti collaterali osservati nello studio APPROACH (94, 98), con particolare riferimento alla comparsa di piastrinopenia severa (per la quale non è disponibile ancora una spiegazione definitiva), attualmente è in fase di sperimentazione un oligonucleotide antisense di III generazione diretto verso apoC-III; questo ASO sarebbe coniugato con un dominio di N-acetylgalattosamina (GalNac) (AKCEA-APO-CIII-LRx) e sembrerebbe associato a minore rischio di trombocitopenia. In un recente poster (103) sono stati presentati i dati preliminari di uno studio in doppio cieco, controllato con placebo, di fase 1-2 su volontari sani con valori di trigliceridi ≥ 200 mg/dL, in cui dosi multiple di AKCEA-APO-CIII-LRx hanno determinato una riduzione di apo C-III del 83% e di trigliceridi del 65%; questo dato sarebbe associato ad una riduzione significativa del colesterolo totale, apoB, non-HDL colesterolo e VLDL e a un aumento della colesterolemia HDL. AKCEA-APO-CIII-LRx sembrerebbe essere ben tollerato e non si

assocerebbe a sintomi simil-influenzali, riduzione delle piastrine o effetti collaterali epatici e renali.

Considerata l'associazione tra ipertrigliceridemia e rischio cardiovascolare, è attualmente in corso un trial multicentrico di fase 2 con AKCEA-APO-CIII-LRx, (ISIS 678354) in doppio cieco, randomizzato, controllato con placebo volto a valutare la sicurezza e la tollerabilità di differenti dosi e regimi posologici di ISIS 678354 nel ridurre i trigliceridi in una coorte di pazienti ipertrigliceridemici con malattia vascolare conclamata (104).

Conclusioni

Sia gli studi condotti sui modelli animali che nell'uomo hanno stabilito con chiarezza come la modulazione genetica e farmacologica di apoC-III abbia un impatto significativo sui livelli delle TRL e dei loro *remnant*. Queste lipoproteine sono considerate di grande interesse da parte della comunità scientifica per il loro ruolo causale nella malattia cardiovascolare. Come ulteriore dato molto importante, l'inibizione farmacologica di apoC-III ha mostrato recentemente risultati promettenti nella cura di malattie gravi, associate ad elevata mortalità e complicanze, quali la FCS.

Tutti questi dati supportano con forza l'importanza di apoC-III come modulatore della cascata lipolitica riservando alla sua inibizione un ruolo centrale per lo sviluppo delle nuove terapie per l'ipertrigliceridemia.

RIASSUNTO

L'ipertrigliceridemia è un disordine complesso, nella maggior parte dei casi di natura poligenica, che colpisce circa il 27% della popolazione generale. La severità dell'ipertrigliceridemia correla con diversi tipi di complicanze. È nota infatti, l'associazione tra ipertrigliceridemia lieve-moderata e rischio cardiovascolare e ipertrigliceridemia severa (trigliceridi >1.000 mg/dl) e rischio di pancreatite acuta. La apolipoproteina C-III (apoC-III) ha un ruolo critico nell'influenzare il metabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi attraverso tre principali meccanismi:

- 1) favorisce l'assemblaggio e la produzione delle VLDL a livello epatico;
- 2) inibisce l'attività della lipoprotein lipasi;
- 3) interferisce con il legame dell'ApoB o ApoE ai recettori epatici, rallentando la rimozione delle TRL e dei loro residui (*remnants*).

Sia gli studi condotti su modelli animali che nell'uomo, hanno dimostrato come apoC-III correli in modo diretto con l'elevazione delle concentrazioni di trigliceridi circolanti mentre bassi o assenti livelli di apoC-III ne determinino una riduzione. Una grande mole di evidenze ha mostrato come nell'uomo le mutazioni con perdita di funzione del gene APOC-III si associno a basso rischio di malattia aterosclerotica. Tutti questi dati hanno evidenziato la possibilità di utilizzare apoC-III come target terapeutico nell'ipertrigliceridemia. Sebbene alcuni farmaci in commercio siano in grado di ridurre i livelli di apoC-III circolanti, spesso non sono sufficienti a raggiungere gli obiettivi terapeutici. Per tale motivazione è stato recentemente formulato un Oligonucleotide Antisense (ASO) in grado di ridurre l'mRNA di apoC-III (Volanesorsen) e conseguentemente, ridurre la trigliceridemia. In questa rassegna mostriamo le evidenze scientifiche relative il ruolo di apoC-III nel metabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi (TRL) mostrando la sua importanza come possibile target terapeutico per la cura sia dell'ipertrigliceridemia severa (e le sue complicanze quali la pancreatite acuta) che del rischio cardiovascolare associato ad elevati livelli di trigliceridi.

Parole chiave: *ApoCIII, ipertrigliceridemie severe, nuove terapie farmacologiche.*

Bibliografia

1. Kastelein JJ. Decade in review-dyslipidaemia: resurgence of targets and compounds to treat dyslipidaemia. *Nat Rev Cardiol.* 2014; 11: 629-631.
2. Brewer HB Jr, Shulman R, Herbert P, et al. The complete amino acid sequence of alanine apolipoprotein (apoC-3), and apolipoprotein from human plasma very low-density lipoproteins. *J Biol Chem.* 1974; 249: 4975-4984.
3. Yassine HN, Trencheska O, Ramrakhiani A, et al. The association of human apolipoprotein C-III sialylation proteoforms with plasma triglycerides. *PLoS One.* 2015; 10: e0144138.
4. Vaith P, Assmann G, Uhlenbruck G. Characterization of the oligosaccharide side chain of apolipoprotein C-III from human plasma very low-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta.* 1978; 541: 234-240.
5. Yao Z. Human apolipoprotein C-III - a new intrahepatic protein factor promoting assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2012; 12: 133-140.
6. Sacks FM. The crucial roles of apolipoproteins E and C-III in apoB lipoprotein metabolism in normolipidemia and hypertriglyceridemia. *Curr Opin Lipidol.* 2015; 26: 56-63.
7. Norum RA, Lakier JB, Goldstein S, et al. Familial deficiency of apolipoproteins A-I and C-III and precocious coronary-artery disease. *N Engl J Med.* 1982; 306: 1513-1519.
8. 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.
9. 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.
10. Crosby J, Peloso GM, Auer PL, et al. Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease. *N Engl J Med.* 2014; 371: 22-31.
11. 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.
12. 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.
13. Caron S, Verrijken A, Mertens I, et al. Transcriptional activation of apolipoprotein CIII expression by glucose may contribute to diabetic dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31: 513-519.
14. Pavlic M, Valero R, Duez H, et al. Triglyceride-rich lipoprotein-associated apolipoprotein C-III production is stimulated by plasma free fatty acids in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 1660-1665.
15. Hernandez C, Molusky M, Li Y, et al. Regulation of hepatic ApoC3 expression by PGC-1beta mediates hypolipidemic effect of nicotinic acid. *Cell Metab.* 2010; 12: 411-419.

16. Laffitte BA, Chao LC, Li J, et al. Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 5419-5424.
17. Morton AM, Furtado JD, Lee J, et al. The effect of omega-3 carboxylic acids on apolipoprotein CII-containing lipoproteins in severe hypertriglyceridemia. *J Clin Lipidol*. 2016; 10: 1442. e4-1451.e4.
18. Hertz R, Bishara-Shieban J, Bar-Tana J. Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipidemic drugs. Suppression of apolipoprotein C-III. *J Biol Chem*. 1995; 270: 13470-13475.
19. Chen M, Breslow JL, Li W, Leff T. Transcriptional regulation of the apoC-III gene by insulin in diabetic mice: correlation with changes in plasma triglyceride levels. *J Lipid Res*. 1994; 35: 1918-1924.
20. Gruber PJ, Torres-Rosado A, Wolak ML, Leff T. Apo CIII gene transcription is regulated by a cytokine inducible NF-kappa B element. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22: 2417-2422.
21. Ramms B, Gordts PLSM. Apolipoprotein CIII in triglyceride- rich lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2018; 29: 171-179.
22. Ito Y, Azrolan N, O'Connell A, et al. Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. *Science*. 1990; 249: 790-793.
23. Jong MC, Rensen PC, Dahlmans VE, et al. Apolipoprotein C-III deficiency accelerates triglyceride hydrolysis by lipoprotein lipase in wild-type and apoE knockout mice. *J Lipid Res*. 2001; 42: 1578-1585.
24. Shachter NS, Ebara T, Ramakrishnan R, et al. Combined hyperlipidemia in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein CII. *J Clin Invest*. 1996; 98: 846-855.
25. Shachter NS, Hayek T, Leff T, et al. Overexpression of apolipoprotein CII causes hypertriglyceridemia in transgenic mice. *J Clin Invest*. 1994; 93: 1683-1690.
26. Merkel M, Loeffler B, Kluger M, et al. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan bound lipoprotein lipase. *J Biol Chem*. 2005; 280: 21553-21560.
27. Kypreos KE, Li X, van Dijk KW, et al. Molecular mechanisms of type III hyperlipoproteinemia: The contribution of the carboxy-terminal domain of ApoE can account for the dyslipidemia that is associated with the E2/E2 phenotype. *Biochemistry*. 2003; 42: 9841-9853.
28. Fong LG, Young SG, Beigneux AP, et al. GPIIIBP1 and plasma triglyceride metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2016; 27: 455-469.
29. Larsson M, Allan CM, Jung RS, et al. Apolipoprotein C-III inhibits triglyceride hydrolysis by GPIIIBP1-bound LPL. *J Lipid Res*. 2017; 58: 1893-1902.
30. Gaudet D, Brisson D, Tremblay K, et al. Targeting APOC3 in the familial chylomicronemia syndrome. *N Engl J Med*. 2014; 371: 2200-2206.
31. Gordts PL, Nock R, Son NH, et al. ApoC-III inhibits clearance of triglyceride rich lipoproteins through LDL family receptors. *J Clin Invest*. 2016; 126: 2855-2866.
32. Foley EM, Gordts PL, Stanford KI, et al. Hepatic remnant lipoprotein clearance by heparan sulfate proteoglycans and low-density lipoprotein receptors depend on dietary conditions in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33: 2065-2074.
33. Gonzales JC, Gordts PLM, Foley EM, Esko JD. Apolipoproteins E and AV mediate lipoprotein clearance by hepatic proteoglycans. *J Clin Invest*. 2013; 23: 2742-2751.
34. 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.
35. Breyer ED, Le NA, Li X, et al. Apolipoprotein C-III displacement of apolipoprotein E from VLDL: effect of particle size. *J Lipid Res*. 1999; 40: 1875-1882.
36. Ebara T, Ramakrishnan R, Steiner G, Shachter NS. Chylomicronemia due to apolipoprotein CIII overexpression in apolipoprotein E-null mice. Apolipoprotein CIII-induced hypertriglyceridemia is not mediated by effects on apolipoprotein E. *J Clin Invest*. 1997; 99: 2672-2681.
37. Mahley RW, Huang Y, Rall SC Jr. Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. *J Lipid Res*. 1999; 40: 1933-1949.
38. 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.
39. Yao Z, Wang Y. Apolipoprotein C-III and hepatic triglyceride-rich lipoprotein production. *Curr Opin Lipidol*. 2012; 23: 206-212.
40. 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.
41. 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.
 42. 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.
 43. 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.
 44. 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.
 45. 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.
 46. Dai L, Chu SP, Wang ZH, Ni HB, Ding X, Tao Y, Ding Y, Ju SQ, Yu J. APOC3 promotes TNF- α induced expression of JAM-1 in endothelial cell via PI3K-IKK2-p65 pathway. *Cardiovasc Pathol.* 2019; 41: 11-17.
 47. Christopoulou E, Tsimihodimos V, Filippatos T, Elisaf M. Apolipoprotein CIII and diabetes. Is there a link? *Diabetes Metab Res Rev.* 2019; 35: e3118.
 48. Talmud PJ, Humphries SE. Apolipoprotein C-III gene variation and dyslipidaemia. *Curr Opin Lipidol.* 1997; 8: 154-158.
 49. Waterworth DM, Talmud PJ, Bujac SR, et al. Contribution of apolipoprotein CIII gene variants to determination of triglyceride levels and interaction with smoking in middle-aged men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 2663-2669.
 50. Dorfmeister B, Cooper JA, Stephens JW, et al. The effect of APOA5 and APOC3 variants on lipid parameters in European Whites, Indian Asians and Afro-Caribbeans with type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1772: 355-363.
 51. Waterworth DM, Talmud PJ, Humphries SE, et al. Variable effects of the APOC3-482C >T variant on insulin, glucose and triglyceride concentrations in different ethnic groups. *Diabetologia.* 2001; 44: 245-248.
 52. Igartua C, Mozaffari SV, Nicolae DL, Ober C. Rare noncoding variants are associated with plasma lipid traits in a founder population. *Sci Rep.* 2017; 7: 16415.
 53. Drenos F, Davey Smith G, Ala-Korpela M, et al. Metabolic characterization of a rare genetic variation within APOC3 and its lipoprotein lipase-independent effects. *Circ Cardiovasc Genet* 2016; 9: 231-239.
 54. Song Y, Zhu L, Richa M, Li P, Yang Y, Li S. Associations of the APOC3 rs5128 polymorphism with plasma APOC3 and lipid levels: a meta-analysis. *Lipids Health Dis.* 2015; 14: 32.
 55. Li WW, Dammerman MM, Smith JD, Metzger S, Breslow JL, Leff T, Common genetic variation in the promoter of the human apo CIII gene abolishes regulation by insulin and may contribute to hypertriglyceridemia. *J. Clin. Invest.* 1995; 96: 2601-2605.
 56. van Capelleveen JC, Bernelot Moens SJ, Yang X, et al. Apolipoprotein C-III levels and incident coronary artery disease risk: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017; 37: 1206-1212.
 57. 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.
 58. 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.
 59. 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.
 60. 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.
 61. 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.
 62. Pullinger CR, Malloy MJ, Shahidi AK, et al. A novel apolipoprotein C-III variant, apoC-III (Gln-38Lys), associated with moderate hypertriglyc-

- eridemia in large kindred of Mexican origin. *J Lipid Res.* 1997; 38: 1833-1840.
63. Pollin TI, Damcott CM, Shen Het al. A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection. *Science.* 2008; 322: 1702-1705.
 64. Cohen JC, Stender S, Hobbs HH. APOC3, coronary disease, and complexities of Mendelian randomization. *Cell Metab.* 2014; 20: 387-389.
 65. Ginsberg HN, Brown WV. Apolipoprotein CIII: 42 years old and even more interesting. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31: 471-473.
 66. 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.
 67. Saleheen D, Natarajan P, Armean IM, Zhao W, Rasheed A, Khetarpal SA, et al. Human knockouts and phenotypic analysis in a cohort with a high rate of consanguinity. *Nature.* 2017; 544: 235-239.
 68. Nordestgaard BG. Triglyceride-rich lipoproteins and atherosclerotic cardiovascular disease: new insights from epidemiology, genetics, and biology. *Circ Res.* 2016; 118: 547-563.
 69. Varbo A, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Elevated remnant cholesterol causes both low-grade inflammation and ischemic heart disease, whereas elevated low-density lipoprotein cholesterol causes ischemic heart disease without inflammation. *Circulation.* 2013; 128: 1298-1309.
 70. Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, West AS, Grande P, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Genetically elevated non-fasting triglycerides and calculated remnant cholesterol as causal risk factors for myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2013; 34: 1826-1833.
 71. Varbo A, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG. Remnant cholesterol as a causal risk factor for ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 61: 427-436.
 72. Nordestgaard BG, Varbo A. Triglycerides and cardiovascular disease. *Lancet.* 2014; 384: 626-635.
 73. Khera AV, Won HH, Peloso GM, et al. Myocardial Infarction Genetics Consortium; DiscovEHR Study Group; CARDIoGRAM Exome Consortium; and Global Lipids Genetics Consortium. Association of rare and common variation in the lipoprotein lipase gene with coronary artery disease. *JAMA.* 2017; 317: 937-946.
 74. Helgadóttir A, Gretarsdóttir S, Thorleifsson G, et al. Variants with large effects on blood lipids and the role of cholesterol and triglycerides in coronary disease. *Nat Genet.* 2016; 48: 634-639.
 75. Wulff AB, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. APOC3 Loss-of-Function Mutations, Remnant Cholesterol, Low-Density Lipoprotein Cholesterol, and Cardiovascular Risk: Mediation- and Meta-Analyses of 137 895 Individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018; 38: 660-668.
 76. Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN, et al. Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2011; 123: 2292-2233.
 77. Norata GD, Tsimikas S, Pirillo A, Catapano AL. Apolipoprotein C-III: From Pathophysiology to Pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2015; 36: 675-687.
 78. Gouni-Berthold I, Berthold HK. Antisense oligonucleotides for the treatment of dyslipidemia. *Curr Pharm Des.* 2011; 17: 950-960.
 79. Ito MK. ISIS 301012 gene therapy for hypercholesterolemia: sense, antisense, or nonsense? *Ann Pharmacother.* 2007; 41: 1669-1678.
 80. Aboul-Fadl T. Antisense oligonucleotides: the state of the art. *Curr Med Chem.* 2005; 12: 2193-2214.
 81. Chan JH, Lim S, Wong WS. Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006; 33: 533-540.
 82. Graham MJ, Lee RG, Bell TA, III, 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.
 83. 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.
 84. Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, Wang J, Peter J, Defesche JC, et al. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J Intern Med.* 2012; 272: 185-196.
 85. Brahm AJ, Hegele RA. Chylomicronaemia-current diagnosis and future therapies. *Nat Rev Endocrinol.* 2015; 11: 352-362.
 86. Chait A, Brunzell JD. Chylomicronemia syndrome. *Adv Intern Med.* 1992; 37: 249-273.
 87. Tremblay K, Methot J, Brisson D, Gaudet D. Etiology and risk of lactescent plasma and severe hypertriglyceridemia. *J Clin Lipidol.* 2011; 5: 37-44.

88. Gaudet D, Methot J, Dery S, Brisson D, Essiembre C, Tremblay G, et al. Efficacy and long-term safety of alipogene tiparvovec (AAV1-LPLS447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial. *Gene Ther.* 2013; 20: 361-369.
89. <https://www.chiesi.com/glybera-in-europa/>, ultimo accesso 2 maggio 2019
90. Grundy SM, Stone NJ, Bailey AL, et al. 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA guideline on the management of blood cholesterol: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2018.
91. 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.
92. 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.
93. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02211209>, ultimo accesso 2 maggio 2019
94. Gaudet D, Digenio A, Alexander VJ, et al. The APPROACH study: a randomized double-blind placebo-controlled, phase 3 study of volanesorsen administered subcutaneously to patients with FCS. *Athero Suppl.* 2017; 263: e10.
95. Hegele RA, Berberich AJ, Ban MR, Wang J, Digenio A, Alexander VJ, et al. Gaudet. Clinical and biochemical features of different molecular etiologies of familial chylomicronemia. *J Clin Lipidol.* 2018; 12: 920-927.e4
96. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02300233>, ultimo accesso 2 maggio 2019
97. Gelrud A, Digenio A, Alexander VJ, Williams KR, 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 Studies. *Athero Suppl.* 2018; 32: 157.
98. 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. *Athero Suppl.* 2017; 28: e1-e2.
99. Arca M, Hsieh A, Soran H, Rosenblit P, O'Dea L, Stevenson M. The effect of volanesorsen treatment on the burden associated with familial chylomicronemia syndrome: the results of the ReFOCUS study. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2018; 16: 537-546.
100. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02527343>, ultimo accesso 2 maggio 2019
101. Joseph J, Shamburek RD, Cochran EK, Gorden P, Brown RJ. Lipid regulation in lipodystrophy versus the obesity-associated metabolic syndrome: the dissociation of HDL-C and triglycerides. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99: E1676-80.
102. Kassai A, Muniyappa R, Levenson AE, Walter MF, Abel BS, Ring M, et al. Effect of Leptin Administration on Circulating Apolipoprotein CIII levels in Patients With Lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016; 101: 1790-1797.
103. Alexander VJ, Digenio A, Xia S, Hurh E, Hughes S, Geary RS, et al. Inhibition of apolipoprotein C-III with GalNac conjugated antisense drug potently lowers fasting serum apolipoprotein C-III and triglyceride levels in healthy volunteers with elevated triglycerides. *J Am Coll Cardiol.* 2018; 71: A1724.
104. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03385239>, ultimo accesso 2 maggio 2019