



Università di Foggia

Scuola di Dottorato in Scienze Mediche e Chirurgiche

Dottorato di ricerca in

***“Scienze neuropsichiatriche, cardiopneumologiche e  
dell’invecchiamento”***

*XXVIII ciclo*

---

*“Studio di associazione tra fattori genetici e livelli  
plasmatici in pazienti trattati con NAO:  
Dabigatran, Rivaroxaban e Apixaban”*

***Tutor***

*Prof. Brunetti Natale Daniele*

***Dottoranda***

*Dott.ssa Dimatteo Claudia*

---

*Esame finale Anno Accademico 2015-2016*

## INDICE

	<b>Pag.</b>
<b>1.0 TERAPIA ANTICOAGULANTE (TAO)</b>	1
<b>2.0 FARMACI ANTICOAGULANTI ORALI ANTAGONISTI DELLA VITAMINA K</b>	
2.1. Epidemiologia	4
2.2. Meccanismo d'azione degli AVK	5
2.3. Indicazioni al trattamento anticoagulante orale con AVK	7
2.4. Controindicazioni degli AVK	9
<b>3.0 FARMACOGENETICA: RIPERCUSSIONI TERAPEUTICHE NELLA PRATICA CLINICA</b>	
3.1. Risposta individuale ai farmaci	14
3.2. Nei geni la chiave della diversità	15
3.3. Polimorfismi genetici che influenzano la risposta ai farmaci	16
3.4. Nel profilo genetico la risposta alla variabilità	17
3.5. I geni coinvolti nel metabolismo dei farmaci	19
<b>4.0 NUOVI ANTICOAGULANTI ORALI (NAO): FARMACOCINETICA E FARMACODINAMICA</b>	
4.1. DABIGATRAN	21
4.2. RIVAROXABAN	25
4.3. APIXABAN	28
<b>5.0 RAZIONALE DELLO STUDIO</b>	31
<b>6.0 MATERIALI E METODI</b>	
6.1. Caratteristiche cliniche e farmacologiche dei pazienti	33
6.2. Dosaggio allo spettrometro di massa	34
6.3. Analisi genetica dei polimorfismi	41
6.4. Analisi statistica	49

	<b>Pag.</b>
<b>7.0 RISULTATI E CONCLUSIONI</b>	
7.1. Parametri clinici e fisiologici dei pazienti e farmaci anticoagulanti utilizzati	50
7.2. Analisi genotipica	52
7.3. Analisi fenotipica	53
7.4. Effetti di ABCB1 e CES1 sui livelli plasmatici	54
<b>8.0 CONCLUSIONI</b>	56
<b>9.0 BIBLIOGRAFIA</b>	58

## **1.0 TERAPIA ANTICOAGULANTE (TAO)**

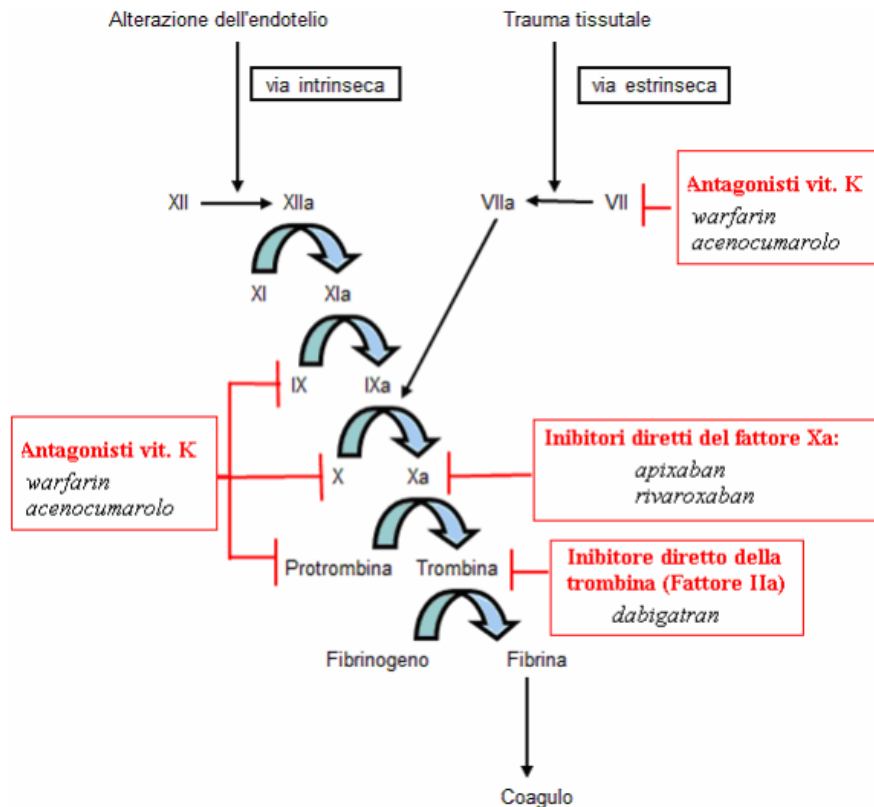
I farmaci anticoagulanti svolgono un ruolo importante nel ridurre le complicanze e la mortalità associate ai disturbi tromboembolici. In assenza di profilassi infatti, il 10-20% dei pazienti ricoverati e il 15-40% dei pazienti sottoposti ad interventi chirurgici, sviluppano trombosi venose profonde (TVP) ed embolie polmonari (EP), e quest'ultime rappresentano la causa di morte più comune in ambito ospedaliero.

Per cinquant'anni il Warfarin, un antagonista della vitamina K (AVK), ha rappresentato l'unico farmaco disponibile ed efficace per la profilassi di eventi tromboembolici e di eventi di fibrillazione atriale non valvolare (FANV). Le principali criticità che caratterizzano gli AVK sono:

- 1) la variabilità individuale nella risposta per effetto della variabilità dei livelli plasmatici di vitamina K, delle interazioni farmacologiche, delle patologie concomitanti e della compliance del paziente;
- 2) la necessità di continui aggiustamenti posologici da parte di personale competente e di un monitoraggio dei valori di tempo di protrombina, espressi come International Normalized Ratio (INR) in un intervallo terapeutico compreso tra 2,0-3,0;
- 3) il rischio emorragico non trascurabile, specie di emorragia intracranica.

Da tempo si è sentita la necessità di individuare nuovi farmaci che siano in grado di superare i limiti dell'attuale terapia anticoagulante orale (TAO). In particolare, l'anticoagulante ideale dovrebbe poter essere somministrato per via orale e in dose prefissata, avere una rapida insorgenza d'azione, un buon profilo di sicurezza (soprattutto in termini di rischio emorragico), essere specifico, avere una farmacodinamica ed una farmacocinetica prevedibile, poche interazioni con cibo e farmaci, avere un'ampia finestra terapeutica, non aver bisogno di un monitoraggio routinario della coagulazione ed essere un farmaco di sintesi al fine di ridurre la possibilità di contaminazioni dovute al materiale di partenza. Per la ricerca di nuovi farmaci, allo scopo di soddisfare i requisiti ideali dell'anticoagulante, ne sono stati prescelti alcuni che agiscono prevalentemente a livello di 2 fasi della cascata coagulativa, in particolare l'inibizione diretta della trombina (fattore IIa) e l'inibizione del fattore Xa. A differenza degli AVK che sono farmaci ad azione indiretta, che agiscono come anticoagulanti abbassando i livelli funzionali delle

proteine pro-coagulanti vitamina K-dipendenti (protrombina e fattori VII, IX e X) e delle proteine anticoagulanti vitamina K-dipendenti (proteine C, S e Z), i nuovi anticoagulanti orali (NAO) sono, invece, farmaci in grado di bloccare direttamente un singolo fattore della coagulazione. La trombina ed il fattore Xa sono bersagli piuttosto indicativi in quanto comuni sia alla via estrinseca che alla via intrinseca della coagulazione (fig.1).



**Fig.1** Cascata coagulativa

Ximelagatran è stato il primo inibitore diretto della trombina ad essere approvato in Europa per la profilassi del tromboembolismo venoso (TVE) a breve termine dopo interventi di chirurgia ortopedica, Ximelagatran è rimasto sul mercato europeo all'incirca per 20 mesi, il 14 febbraio 2006, AstraZeneca, ne ha annunciato il ritiro a livello mondiale per tossicità epatica. Nel marzo 2008 l'EMEA ha approvato Dabigatran, per la prevenzione di malattie tromboemboliche in seguito a sostituzione dell'anca o del ginocchio e nell'agosto 2011 per l'uso in pazienti con FANV. Boehringer Ingelheim ha sviluppato dabigatran, inibitore non peptidico con un residuo centrale benzimidazolico 1,2,5-trisostituito, sulla base della struttura

cristallina ai raggi-X del NAPAP, un inibitore peptido-simile, complessato con trombina di origine bovina. Grazie ad una serie di analisi della struttura a raggi-X, è stata ottimizzata l'attività ottenendo un'inibizione della trombina, nel range basso nano-molare, anche se l'energia di legame è dovuta principalmente ad interazioni idrofobiche o non-polari. Il farmaco è preparato sotto forma di capsule contenenti un profarmaco inattivo, dabigatran etexilato, che dopo somministrazione orale viene rapidamente assorbito e idrolizzato a dabigatran. Nel 2008 e nel 2011 l'EMA ha approvato anche Rivaroxaban e Apixaban, inibitori diretti del fattore Xa. Gli aspetti innovativi dei nuovi anticoagulanti orali sono rappresentati dal fatto che: inducono l'effetto anticoagulante rapidamente; la gestione dei pazienti è semplificata, non sono necessari controlli routinari della coagulazione e dosi personalizzate; e sono segnalate poche interazioni con alimenti e con farmaci. Rimangono però problemi da risolvere fra cui l'assenza di trattamenti in grado di antagonizzare rapidamente l'effetto anticoagulante che rappresenta tuttora un'importante incognita nella gestione delle emergenze emorragiche, chirurgiche o traumatiche<sup>1</sup>.

## **2.0 I FARMACI ANTICOAGULANTI ORALI ANTAGONISTI DELLA VITAMINA K (AVK)**

Nel corso degli ultimi decenni, la TAO con gli AVK ha rappresentato il principale presidio terapeutico per la prevenzione e per il trattamento di numerose patologie tromboemboliche, prevalentemente venose. Il WARFARIN e gli altri AVK esercitano la loro attività anticoagulante tramite l'inibizione della sintesi dei fattori della coagulazione vitamina K dipendenti (II, VII, IX e X) e delle proteine anticoagulanti C e S, mediante l'inibizione competitiva dell'enzima epossido reduttasi<sup>2</sup> e numerosi studi ne hanno dimostrato l'efficacia antitrombotica.

### *2.1. Epidemiologia*

Grazie alla maggiore accuratezza diagnostica, al progressivo aumento dell'età media della popolazione generale e, di conseguenza, del numero di pazienti con malattie croniche, l'utilizzo della TAO è in continuo aumento.

Viene, infatti, stimato che circa l'1-2% della popolazione generale e circa l'8% della popolazione ultra-ottantenne assuma TAO per diverse patologie, come fibrillazione atriale, cardiopatia dilatativa, valvulopatie, malattia tromboembolica venosa, protesi valvolari cardiache<sup>3-4</sup>.

Indipendentemente dall'indicazione, gli AVK presentano l'inconveniente di una stretta finestra terapeutica tra efficacia anticoagulante e rischio emorragico; le evidenze riscontrate nei trials clinici hanno suggerito che essi sono inoltre dovute non solo alla presenza di varianti geniche presenti su geni facenti parte della famiglia del citocromo P450 (CYP450) (nello specifico della sottoclasse enzimatica CYP2C9) e dell'enzima vitamina K epossido-reduttasi (VKOR), ma anche da diversi fattori tra i quali l'età, il body mass index (BMI), l'assunzione di vitamina K attraverso la dieta, la concomitante terapia farmacologica, i disordini della tiroide e della funzionalità epatica.

I pazienti che ne fanno uso sono perciò costretti a un monitoraggio laboratoristico regolare e sistematico per ridurre sia le complicanze emorragiche che quelle trombotiche, oltre che a limitazioni alimentari ed a rischi in caso di molti altri trattamenti farmacologici. In ogni caso, nonostante queste cautele, il mantenimento dei valori di INR entro l'intervallo raccomandato (2,0 – 3,0) è ottenuto in poco più

della metà dei casi, riducendo l'efficacia terapeutica. E' noto, infatti, come sia sufficiente una variabilità del 10% dal range terapeutico stabilito per indurre un incremento significativo di mortalità e morbidity<sup>5</sup>.

## 2.2. Meccanismo d'azione degli AVK

Farmacocinetica. Tra gli AVK, il warfarin è quello maggiormente utilizzato in Nord America e in Europa. Il warfarin è una miscela racemica 50:50 di due isomeri attivi (enantiomeri R ed S), altamente solubile in acqua che viene rapidamente assorbita dal tratto gastroenterico e presenta un'elevata biodisponibilità (circa 100%). Una volta raggiunto il circolo ematico, si lega per il 99% all'albumina plasmatica e ciò spiega il ridotto volume di distribuzione. Dal momento che solo la frazione libera del farmaco è farmacologicamente attiva, variazioni dell'albuminemia possono modificarne l'attività. La concentrazione plasmatica massima si raggiunge dopo circa 90 minuti dalla somministrazione orale, l'emivita plasmatica è di 36-42 ore, e per l'isomero R può arrivare a 58 ore. Il warfarin e gli altri AVK sono metabolizzati a livello epatico ad opera degli enzimi del complesso CYP450 attraverso vie distinte per le due isoforme R ed S. L'enantiomero S, circa 3 volte più potente dell'enantiomero R, è trasformato soprattutto dall'enzima CYP2C9 e in misura minore dall'enzima CYP3A4. L'enantiomero R, invece, è principalmente trasformato dagli enzimi CYP1A2 e CYP3A4 e in misura minore dal CYP2C19<sup>6-8</sup> (fig.2).



**Fig.2** Farmacocinetica del Warfarin



Farmacodinamica. Gli AVK inibiscono la sintesi epatica dei fattori della coagulazione vitamina K-dipendenti. In particolare, la sintesi dei fattori II, VII, IX e X comprende un processo di carbossilazione nel quale la vitamina K in forma ridotta cede il gruppo carbossilico e si ossida. La vitamina K ossidata, per essere utilizzata in un nuovo ciclo di carbossilazione, deve essere riconvertita nella sua forma ridotta dall'enzima VKOR. Gli AVK inibiscono tale enzima e, in tal modo, impediscono la ri-conversione della vitamina K ossidata in forma ridotta<sup>9</sup> (fig.3).

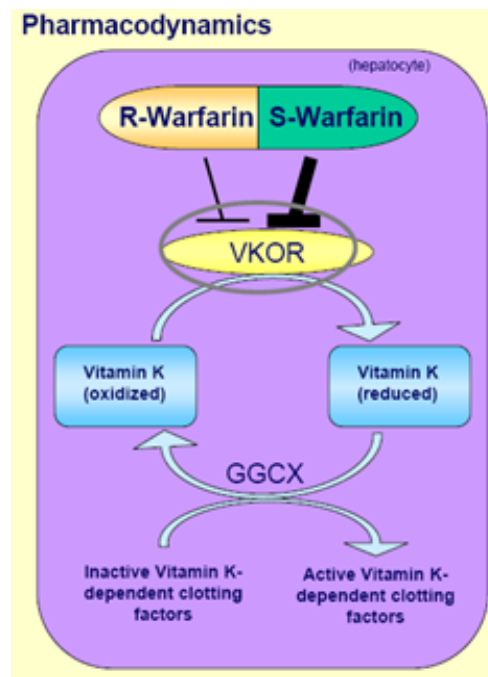


Fig.3 Farmacodinamica del Warfarin

E' importante ricordare che gli AVK inibiscono anche la carbossilazione di alcune proteine anticoagulanti fisiologiche vitamina K-dipendenti (Proteina C e Proteina S), e perciò essi hanno anche una potenziale d'azione pro-coagulante specie nella fase iniziale della terapia. Sebbene l'effetto anticoagulante degli AVK sia predominante, un transitorio stato pro-coagulante può divenire significativo in particolari condizioni come quando la terapia con AVK è iniziata dopo un evento trombotico acuto (associato, di per sé, ad una riduzione dei livelli degli anticoagulanti naturali). Inoltre, questo effetto può essere anche spiegato da una minore sensibilità individuale al farmaco<sup>9-11</sup>.

Per evitare questo transitorio effetto paradossale in genere la terapia eparinica è associata per qualche giorno alla TAO fin tanto che si raggiunge il pieno effetto

terapeutico e valori di tempo di protrombina (PT), espressi come INR nell'intervallo terapeutico indicato.

### 2.3. Indicazioni al trattamento anticoagulante orale con AVK

E' importante ricordare che, mentre la posologia e la durata della TAO possono variare a seconda delle indicazioni, le modalità di monitoraggio ed il rischio emorragico sono simili in tutti i pazienti. La TAO è attualmente utilizzata nella terapia e nella prevenzione di patologie tromboemboliche (prevalentemente di tipo venoso) e patologie cardiache come sotto descritte.

- ✓ La *fibrillazione atriale* (FA) è l'aritmia cardiaca in assoluto più frequente ed è destinata ad aumentare nei prossimi decenni considerando il progressivo invecchiamento della popolazione. La fibrillazione atriale è associata ad un aumento del rischio di ictus e di malattie tromboemboliche come la TVP e l'EP. La FA si associa a un rischio di ictus cerebrale di circa cinque volte in più rispetto a chi non la presenta e per questo motivo è fondamentale adottare dei criteri di valutazione per stabilire l'entità del rischio relativo. Poiché il rischio di stroke varia con l'età, il sesso e la presenza di comorbidità, ci si affida a degli 'score' precedentemente stabiliti per quantizzarlo. La diagnosi di FA, prima che si verifichino le complicazioni, è riconosciuta come una priorità per la prevenzione di ictus<sup>12</sup>. Recenti dati raccolti in studi epidemiologici su pazienti ricoverati con dispositivi impiantati<sup>13</sup>, e attraverso Holter elettrocardiogramma<sup>14</sup> rafforzano l'ipotesi che anche brevi episodi 'silent' di FA esprimono un aumento del rischio di ictus.

La FA colpisce circa l'1% della popolazione nei paesi occidentali<sup>15</sup>. La popolazione affetta aumenta con l'età e, a parità di età è maggiore nei maschi rispetto alle femmine. I dati di letteratura evidenziano che la FA incrementa del 5% il rischio di ictus ischemico. La FA è responsabile del 15% circa di tutti gli ictus nella popolazione generale e del 30% degli ictus nei soggetti con più di 80 anni<sup>16-18</sup>. Anche l'incidenza varia con l'aumentare dell'età: da 0.02% per soggetti di età inferiore a 40 anni, fino al 3.9% nei soggetti di età superiore a 80 anni. La FANV, data la sua elevata prevalenza nella popolazione generale, ed in particolare nella popolazione anziana,

rappresenta una delle più comuni indicazioni alla TAO. Nei pazienti affetti da tale aritmia, gli AVK sono utilizzati per la prevenzione di eventi cardioembolici, tenendo ovviamente conto sia del rischio emorragico che di quello trombotico. Per questo, l'indicazione alla TAO nei pazienti con FA si basa sulla stratificazione del rischio tromboembolico utilizzando il punteggio CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>VASc<sup>19</sup>, modello di riferimento delle principali linee guida internazionali sulla FA (tab.1). Con un punteggio uguale a 0 il paziente con FA è considerato a rischio tromboembolico basso; uguale a 1 il rischio è moderato/intermedio; uguale o superiore a 2 il rischio tromboembolico è alto. Tale trattamento, riduce significativamente l'incidenza di ictus cardioembolico sia rispetto al placebo sia rispetto alla terapia antiaggregante<sup>20</sup>.

**Tab.1 Fattori di rischio tromboembolico e punteggio CHA2DS2-VASc**

<b>Lettere (acronimo)</b>	<b>Fattori di rischio tromboembolico</b>	<b>Punteggio</b>
<b>C</b>	<b>Insufficienza cardiaca congestizia</b> con frazione eiezione ventricolo sinistro ≤ 40% - Punteggio ≥ II NYHA	1
<b>H</b>	<b>Iperensione arteriosa sistemica</b> per valori costantemente al di sopra di 140/90 mmHg o per ipertensione trattata	1
<b>A</b>	<b>Età ≥ 75 anni</b>	2
<b>D</b>	<b>Diabete mellito</b>	1
<b>S</b>	<b>Pregresso ictus/TIA/tromboembolismo arterioso</b>	2
<b>V</b>	<b>Patologie vascolari</b> (pregresso infarto miocardico, arteriopatia periferica, placca aortica)	1
<b>A</b>	<b>Età compresa tra 65-74 anni</b>	1
<b>S</b>	<b>Sesso femminile</b>	1

- ✓ *Valvuloprotesi cardiache*: la sostituzione delle valvole cardiache con protesi valvolari si associa ad un elevato rischio cardioembolico e, di conseguenza, rappresenta un'importante indicazione alla TAO. La posologia e la durata della TAO varia a seconda del tipo della valvola cardiaca e della concomitante presenza di altri fattori di rischio per eventi cardio-embolici (FA concomitante, infarto miocardico, infradimento atriale sinistro, stato di

ipercoagulabilità, ridotta frazione di eiezione)<sup>21,22</sup>. Nella maggior parte dei casi in questi pazienti la terapia viene prolungata per tutta la vita.

- ✓ Il *tromboembolismo venoso* (TEV) comprende principalmente la TVP degli arti inferiori e l'EP. Manifestazioni meno frequenti in sedi "atipiche" sono la TVP degli arti superiori, le trombosi venose splancniche e le trombosi venose cerebrali. In caso di TVP ed EP associate a un fattore di rischio transitorio (trauma e/o frattura, intervento chirurgico, gravidanza/puerperio, terapia estroprogestinica, malattia medica acuta associata ad allentamento prolungato) la TAO è, di solito, raccomandata per 3 mesi<sup>23</sup>. Una durata della TAO di almeno 3 mesi, con l'indicazione a valutarne la prosecuzione a tempo indeterminato, è indicata in caso di TVP e EP non associate a fattori di rischio noti (TEV idiopatico)<sup>23</sup>. Invece, in presenza di fattori di rischio persistenti (alcune patologie oncologiche in fase attiva) o permanenti (deficit di antitrombina, proteina C, proteina S o sindrome da anticorpi antifosfolipidi) la TAO dovrebbe essere continuata a tempo indeterminato<sup>23</sup> o fintanto che la patologia sia attiva, anche se le linee guida non si pronunciano in maniera definitiva su questa tesi.

#### 2.4. Controindicazioni degli AVK

A fronte della loro provata efficacia, gli AVK presentano importanti limitazioni riconducibili alle loro caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche che ne rendono problematico l'impiego nella pratica clinica sia per le difficoltà del terapeuta a individuare la giusta posologia, che per i benefici che il paziente ne ricava. Limiti importanti sono: il lento inizio d'azione, elevata variabilità interindividuale di risposta basata sul metabolismo del citocromo P450-dipendente, stretta finestra terapeutica, necessità di un monitoraggio routinario del livello di anticoagulazione (INR), numerose interazioni farmacologiche, influenza di stati metabolici (febbre, funzionalità tiroidea) e influenze alimentari con conseguente variabilità anche intra-individuali. Basandoci sulle considerazioni di questi limiti deduciamo che sono indispensabili frequenti aggiustamenti posologici, monitorando l'INR per contenerlo all'interno del range indicato per il tipo di patologia come elencato in tab.2.

**Tab.2 Indicazioni alla terapia anticoagulante e range di INR e target di coagulazione**

<b>PATOLOGIA</b>	<b>RANGE TERAPEUTICO</b>	<b>TARGET</b>
<b>Profilassi del Tromboembolismo venoso</b>	<b>1.5-2.5</b>	<b>2</b>
<b>Trattamento della TVP/EP, FA</b>	<b>2-3</b>	<b>2.5</b>
<b>Valvulopatie, cardiomiopatia dilatativa</b>	<b>2-3</b>	<b>2.5</b>
<b>Protesi valvolari biologiche</b>	<b>2-3</b>	<b>2.5</b>
<b>Infarto miocardico</b>	<b>2-3</b>	<b>2.5</b>
<b>Protesi valvolari a doppio emidisco aortiche a RS</b>	<b>2-3</b>	<b>2.5</b>
<b>Protesi valvolari meccaniche</b>	<b>2.5-3.5</b>	<b>3</b>
<b>Sindrome da anticorpi antifosfolipidi</b>	<b>3-4</b>	<b>3.5</b>

E' importante ricordare che l'INR riflette anche un aumento del rischio trombotico clinico per valori al di sotto della finestra terapeutica, e un aumento esponenziale del rischio emorragico per valori  $>4^4$ .

Nella pratica clinica, tutto questo si traduce in un sottoutilizzo degli AVK, in una inadeguata coagulazione e in frequenti interruzioni del trattamento da parte dei pazienti più anziani per i seguenti motivi:

- ✓ *Rischio emorragico.* Il limite più grave degli AVK è l'aumento del rischio di sanguinamento, sia minore che maggiore. Globalmente gli episodi emorragici (maggiori e/o minori) presentano un'incidenza di 18-20/100 pazienti-anno, mentre le sole emorragie maggiori hanno un'incidenza di 3.5/100 pazienti-anno<sup>20,24</sup>. Diversi fattori possono influenzare il rischio di sanguinamento durante terapia con AVK, alcuni dei quali legati ad aspetti della terapia stessa (INR target, qualità del monitoraggio), altri legati a comorbidità, terapie concomitanti o a caratteristiche dei pazienti. Nel corso degli anni sono stati sviluppati diversi modelli in grado di predire il rischio emorragico in pazienti trattati con AVK; valutando una serie di variabili (es: ipertensione, ictus, farmaci, sanguinamento), è stato definito un cut-off di rischio emorragico maggiore associato ad un valore  $\geq 3$  ( $>3\%/anno$ )<sup>25</sup>.
- ✓ *Interazioni sull'attività anticoagulante.* La farmacodinamica e farmacocinetica degli AVK risentono dell'influenza di numerosi fattori genetici, nutrizionali, farmacologici, fisio-patologici. Le modifiche che ne

derivano possono provocare alterazioni significative dell'attività anticoagulante, con aumento del rischio trombotico o emorragico.

- *Fattori genetici.* I fattori genetici responsabili di alterazioni dell'attività degli AVK sono rappresentati in particolare da polimorfismi (SNPs) di un gene facente parte della famiglia del CYP450 coinvolto nel metabolismo degli AVK (CYP2C9) e del gene del complesso della vitamina K ossido-reduttasi (VKORC1)<sup>8</sup>. Mutazioni del gene codificante il CYP2C9 risultano in una riduzione della clearance degli AVK e, quindi, in un aumento del rischio emorragico. Di conseguenza, i pazienti portatori di tali mutazioni richiedono dosaggi di AVK più bassi.

Per quanto concerne il CYP2C9 l'allele wild-type (WT), con attività normale, è denominato CYP2C9\*1, la variante CYP2C9\*2 (Arg144Cys), correlata ad un fenotipo di risposta lieve/intermedio, presenta un'attività enzimatica del 12% rispetto alla forma WT. La variante CYP2C9\*3 (Ile359Leu) con fenotipo di risposta lieve è, invece, correlata ad un'attività enzimatica del 5% rispetto alla forma WT (Tab.3).

**Tab.3 Polimorfismi delle varianti del gene CYP2C9**

	<b>ESONE 3</b>	<b>ESONE 7</b>
<b>CYP2C9*1</b>	Arg144	Ile359
<b>CYP2C9*2</b>	<b>Cys144</b>	Ile359
<b>CYP2C9*3</b>	Arg144	<b>Leu359</b>

Le varianti \*2 e \*3 sono presenti in percentuali diverse nelle differenti etnie:

- Europei: variante \*2 nel 10.7% della popolazione e la \*3 nell'8.5%;
- Asiatici: variante \*2 nello 0% della popolazione e la \*3 nell'1-2%;
- Africani: variante \*2 nel 2.9% della popolazione e la \*3 nello 0.8%.

Nel gene VKORC1 il polimorfismo associato ad una variabilità di risposta al farmaco è una sostituzione silente in posizione -1639, in cui una guanina viene sostituita da una adenina; nei pazienti con la variante -A1639G VKORC1 si ha una riduzione della produzione dell'enzima e, pertanto, sono richieste dosi minori di warfarin rispetto alla condizione wild-type. La

frequenza dell'allele mutato (MAF) è del 37% nei caucasici e del 14% negli africani. Nonostante la validità di questi test genetici sia stata ampiamente dimostrata, la genotipizzazione delle varianti del gene VKORC1 e del gene CYP2C9 non è praticata come valutazione pretrattamento di routine sia per l'elevato costo di questi, sia per l'impossibilità di effettuarli in tutti i centri di sorveglianza dei pazienti anticoagulati perchè trattasi di test altamente specialistici.

- *Fattori nutrizionali.* Sono note interazioni degli AVK con numerosi alimenti. Come è intuibile il principale micronutriente interferente con gli AVK è la vitamina K. Tale vitamina è presente in diverse quantità in numerosi alimenti e significative variazioni dell'apporto dietetico di tale vitamina possono essere riscontrate sia in soggetti sani che malati (diete dimagranti, alimentazione parenterale, antibiocoterapia, malassorbimento). Tali fluttuazioni devono essere prese in considerazione perché impattano direttamente sull'efficacia anti-trombotica degli AVK.
- *Fattori farmacologici.* Gli AVK interagiscono con numerosi farmaci. Tra i meccanismi di interazione farmacologica uno dei principali è rappresentato dall'effetto di alcuni farmaci sul metabolismo epatico degli AVK. Infatti, mentre alcuni farmaci (metronidazolo, trimetoprim/sulfametossazolo e amiodarone) inibiscono il metabolismo del warfarin, potenziandone l'effetto, altri (barbiturici, carbamazepina, rifampicina e azatioprina), inducendone il metabolismo epatico, ne riducono l'azione anticoagulante. Altro meccanismo responsabile di interazioni farmacologiche deriva dall'azione di alcuni farmaci sulla sintesi o sulla clearance dei fattori della coagulazione vitamina K-dipendenti. In dettaglio, i farmaci che inibiscono la conversione della vitamina K da forma ossidata a forma ridotta (cefalosporine di II e III generazione), che inibiscono il complesso VKORC (paracetamolo) e che aumentano il metabolismo dei fattori della coagulazione (tiroxina) determinano un aumento dell'effetto anticoagulante degli AVK. Infine, anche se non dipendente da interazione di tipo farmacodinamico/farmacocinetico, non bisogna dimenticare che l'assunzione concomitante di altri farmaci attivi

sull'emostasi (acido acetilsalicilico, anti-infiammatori non steroidei) provoca un aumento del rischio di sanguinamento in corso di terapia con AVK.

- *Condizioni fisio-patologiche.* Tra le condizioni patologiche, le disfunzioni epatiche, la febbre, l'ipertiroidismo, lo scompenso cardiaco e l'insufficienza renale grave sono associate a un'aumentata sensibilità agli AVK e, quindi, ad un aumento del rischio emorragico. Un importante aspetto da ricordare è l'effetto dell'invecchiamento sulla TAO. Con l'avanzare dell'età, si verifica una riduzione delle scorte epatiche di vitamina K e, quindi, della concentrazione plasmatica dei fattori della coagulazione vitamina K-dipendenti. Ne consegue un aumento della sensibilità agli AVK e la necessità di assumere dosi minori. Al contrario, alcune componenti del fumo di sigaretta sono in grado di indurre alcuni enzimi coinvolti nel metabolismo degli AVK (CYP1A2). Infatti, dopo sospensione del fumo di sigaretta, è stata documentata una riduzione delle dosi di AVK necessarie per ottenere lo stesso grado di azione anticoagulante.

A causa di questi limiti significativi degli AVK, nel corso dell'ultimo decennio, la ricerca farmacologica ha portato allo sviluppo di nuovi farmaci anticoagulanti orali, principalmente inibitori orali della trombina (FIIa) e del FXa, che sono coinvolti nella via comune finale della cascata coagulativa. I nuovi farmaci anticoagulanti orali sono stati sviluppati con l'obiettivo di fornire un'efficacia superiore o almeno paragonabile a quella degli AVK, di avere però un profilo farmacocinetico prevedibile, una bassa variabilità intra- ed inter-individuale, un ridotto rischio emorragico e un più ampio indice terapeutico, caratteristiche che eliminerebbero la necessità di monitoraggio laboratoristico di routine<sup>20</sup>. La necessità di un continuo monitoraggio laboratoristico, in alcune circostanze cliniche quoad vitam, costituisce in tutto il mondo la maggiore causa di ridotta compliance o di rifiuto della terapia con AVK in pazienti con chiara indicazione alla stessa, e pertanto superare questo limite è un obiettivo importante nella efficacia e sicurezza della terapia anticoagulante orale.

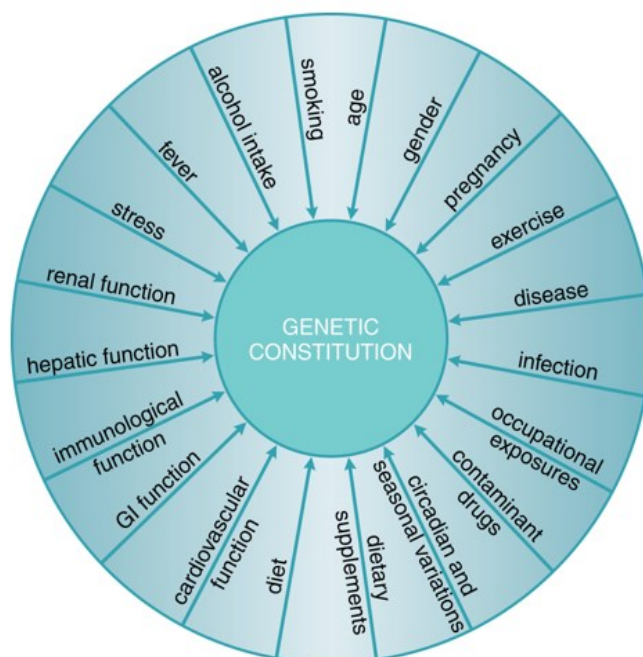


### 3.0 FARMACOGENETICA: RIPERCUSSIONI TERAPEUTICHE NELLA PRATICA CLINICA

#### 3.1. Risposta individuale ai farmaci

La variabilità nella risposta al trattamento farmacologico tra paziente e paziente costituisce da sempre uno dei problemi più rilevanti nella pratica clinica. Le risposte individuali ai farmaci, variano molto: si possono, infatti, osservare in alcuni pazienti rispetto ad altri, effetti terapeutici ridotti o addirittura assenti, reazioni avverse o effetti collaterali, nonostante sia stato somministrato lo stesso farmaco con la stessa posologia.

Tale variabilità, nel passato, era attribuita principalmente all'influenza di fattori non genetici come l'età, il sesso, lo stato nutrizionale, quello di funzionalità renale, epatica, la concomitante assunzione di altri farmaci. Attualmente si ritiene che, oltre tali fattori, giochino un ruolo importante nella risposta individuale ai farmaci anche quelli ereditari. Le conseguenze cliniche della variabilità interindividuale nella risposta al trattamento farmacologico possono essere rappresentate dal fallimento terapeutico (mancata o solo parziale efficacia della terapia), da effetti collaterali di un determinato principio attivo o da reazioni avverse anche gravi e talvolta fatali (Fig.4) (Goodman and Gilman, 2011).



**Fig. 4** Fattori esogeni ed endogeni che contribuiscono alla variabilità della risposta farmacologica.

### *3.2. Nei geni la chiave della diversità*

La farmacogenetica nasce intorno agli anni cinquanta quando i ricercatori cominciarono a pensare che anche la risposta ai farmaci potesse essere regolata, almeno in parte, dai geni e che la variabilità di reazione a un certo principio attivo da parte di individui diversi non fosse altro che il riflesso delle differenze genetiche.

La farmacogenetica studia le variazioni inter-individuali nella sequenza del DNA in relazione alla risposta ai farmaci, in tal modo si ha la possibilità di predire la risposta di un paziente ad un certo farmaco, grazie ad un test genetico di routine, fino ad arrivare ad un'individualizzazione della terapia, "il farmaco giusto al paziente giusto".

I test del DNA, basati su queste variazioni genetiche, possono predire come un paziente risponderà a quel particolare farmaco. I clinici potranno utilizzare questa informazione per decidere la terapia ottimale e per personalizzare il dosaggio; i benefici consisteranno in una ridotta incidenza di reazioni avverse, in migliori esiti clinici ed in costi ridotti. Questi test rappresentano il primo passo verso terapie paziente-specifiche<sup>26,27</sup>.

Con i test di farmacogenetica è possibile identificare molte variazioni nella struttura dei geni che codificano per enzimi del metabolismo dei farmaci, per proteine trasportatrici o proteine bersaglio (recettori, canali ionici, enzimi) di farmaci e correlarle alle variazioni inter-individuali nella risposta agli xenobiotici, individuando vari fattori genetici predittivi della tossicità e della risposta terapeutica al trattamento farmacologico. Un paziente con un metabolismo rapido, per esempio, può richiedere dosi più elevate e più frequenti per raggiungere le concentrazioni terapeutiche; invece un paziente con un metabolismo lento può avere bisogno di dosi più basse e meno frequenti per evitare la tossicità, specialmente nel caso di farmaci con un ristretto margine di sicurezza.

Inoltre, identificando gli individui che con molta probabilità possono manifestare una reazione avversa ad uno specifico trattamento farmacologico, i test di farmacogenetica aiutano il medico nella scelta del farmaco e della dose ottimale per ciascun paziente, accorciando i tempi in cui si cerca la giusta posologia della terapia diminuendone i rischi di tossicità. Analogamente, questi test sono potenzialmente

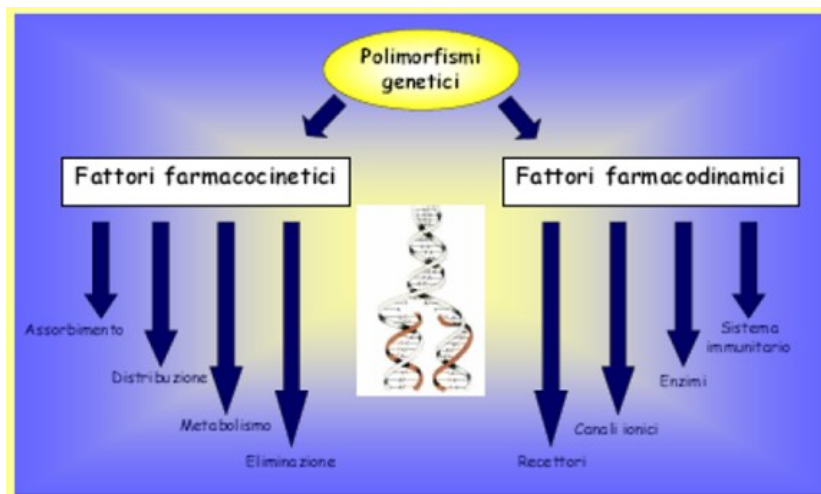
utili nella selezione dei pazienti che con maggiore probabilità beneficiano dal punto di vista terapeutico di uno specifico trattamento farmacologico.

La farmacogenetica punta a una personalizzazione dei trattamenti, cioè a farmaci o combinazioni di farmaci che sono efficaci per ciascun paziente, a secondo del suo specifico patrimonio genetico.

### 3.3. Polimorfismi genetici che influenzano la risposta ai farmaci

Il destino dei farmaci nell'organismo (farmacocinetica) e i loro effetti terapeutici e tossici (farmacodinamica) sono regolati da processi complessi ai quali partecipano, cooperando, numerose proteine deputate al trasporto e al metabolismo dei farmaci, o coinvolte nel loro meccanismo di azione, a loro volta codificate da geni diversi (Fig.5).

Nell'uomo si ritiene che la maggioranza dei geni contenga variazioni casuali della sequenza nucleotidica tra i diversi individui, sviluppatasi nel corso dell'evoluzione; quando tali variazioni avvengono nella sequenza codificante o regolatoria possono portare all'inserzione di un aminoacido diverso a livello di una specifica posizione nella proteina e conseguentemente a modificazioni della sua funzione o influenzare i meccanismi di trascrizione e traduzione, modulando quindi i livelli di espressione dei prodotti genici (mRNA e proteine).



**Fig. 5** Fattori farmacocinetici e farmacodinamici possibili bersagli di polimorfismi genetici

Le variazioni nella sequenza del DNA che sono presenti almeno nell'1% della popolazione sono definite polimorfismi. Tali polimorfismi genici danno luogo a enzimi con diversi livelli di attività metabolica o a recettori con diversa affinità per il farmaco, modificando la risposta farmacologica di un individuo. Le variazioni genetiche riguardano più spesso un singolo nucleotide e sono pertanto definite polimorfismi a singolo nucleotide (SNP)<sup>28</sup>, ma possono interessare anche più nucleotidi o anche ampi tratti di DNA: si tratta ad es. di sostituzioni, inserzioni, delezioni, amplificazioni e traslocazioni<sup>29</sup>. Esse si riferiscono a tratti monogenici, cioè a polimorfismi di un singolo gene codificante una proteina coinvolta nel metabolismo di un farmaco o nel suo effetto che causano risposte individuali variabili ai farmaci.

#### *3.4. Nel profilo genetico la risposta alla variabilità*

Un farmaco, quando entra nell'organismo, si distribuisce al suo interno e a questo punto può essere metabolizzato, attivato, coniugato e infine escreto.

Supponendo che un certo farmaco, per avere effetto, abbia bisogno di essere metabolizzato e poi trasportato tramite un recettore all'interno della cellula, e che metabolismo e trasporto siano controllati da due geni diversi che possono essere polimorfici, la variabilità di risposta sarà determinata dalle diverse interazioni delle varianti di questi due geni.

L'efficacia terapeutica del farmaco dipenderà quindi dall'interazione tra i due geni polimorfici.

Questo significa che, se consideriamo solo il metabolismo del farmaco, a seconda del patrimonio genetico, cioè se l'individuo presenta 2 alleli wild type (omozigote), uno wild-type e uno mutato (eterozigote) o entrambi mutati (omozigote mutato), avremo concentrazioni di farmaco nel sangue differenti (più basse, più alte e altissime); lo stesso se consideriamo il gene che controlla il recettore del farmaco, a seconda che si tratti di individui omozigoti selvatici, eterozigoti o omozigoti mutati, la capacità di trasportare il farmaco nella cellula varierà da individuo con alleli wild-type che sarà in grado di trasportare il farmaco in modo efficace e rapido ad individuo con alleli mutati che non presenterà il recettore o ne avrà uno difettoso.

Il profilo genetico di un individuo, quindi, determina sia le caratteristiche dei bersagli (target) dei farmaci che delle proteine coinvolte nel processo del loro assorbimento e metabolismo. La variazione del nucleotide di un singolo gene può portare alla formazione di una proteina diversa nella struttura e nella funzione e pertanto ad una modifica della capacità dell'organismo umano di utilizzare e metabolizzare i farmaci. Un numero relativamente piccolo di enzimi farmaco-metabolizzanti (DMEs) è responsabile del metabolismo della maggior parte delle terapie farmacologiche oggi impiegate nell'uso clinico. Esiste un ristretto numero di polimorfismi rilevanti nell'ambito di questi enzimi, e molti di loro danno origine ad un mancato effetto terapeutico o ad un'esagerata risposta clinica al farmaco.

Il polimorfismo genetico negli DMEs dà origine alla formazione di quattro sottogruppi di individui che hanno diversità apprezzabili nella loro capacità di metabolizzare i farmaci per ciascun metabolita attivo o inattivo:

- a. metabolizzatori poveri o lenti (Poor Metabolizer - PMs): sono persone che possiedono una capacità d'attivazione dei farmaci estremamente ridotta o assente; presentano una mutazione in entrambi gli alleli del gene.
- b. metabolizzatori intermedi (Intermediate Metabolizer - IM) presentano un allele normale ed uno attivo del gene e possono richiedere, per un'azione terapeutica ottimale, un dosaggio farmacologico inferiore alla norma.
- c. metabolizzatori estesi (Extensive Metabolizer - EMs): sono persone dotate di un normale metabolismo farmacologico. Di solito presentano due alleli attivi del gene.
- d. ultra metabolizzatori (Ultra-Metabolizer - UMs): sono persone con un'aumentata espressione dei geni coinvolti nel metabolismo dei farmaci, a causa della quale possono richiedere, per un'azione terapeutica ottimale, un dosaggio farmacologico superiore alla norma; presentano tre o più alleli attivi, a causa di una duplicazione di un allele attivo.

Dosi standard di farmaco con una curva dose-risposta ripida o un range terapeutico ristretto possono produrre reazioni farmacologiche avverse, tossicità, o diminuita efficacia nei PMs. Dosi standard di farmaco, quando assunte da UMs, possono essere incapaci di produrre l'effetto desiderato.

Determinare quale sia il genotipo di un individuo può essere di notevole importanza non solo nel breve, ma anche nel lungo termine, in quanto il genotipo, come tutti i caratteri genetici, “non è soggetto a cambiare nel corso dell’esistenza”.

### *3.5. I geni coinvolti nel metabolismo dei farmaci*

Il sistema enzimatico del citocromo P450 svolge un ruolo centrale nel metabolismo ossidativo dei farmaci. Questi citocromi sono molto importanti, in quanto sono responsabili del metabolismo di fase I per molti farmaci di uso corrente e per alcune sostanze endogene (es. ormoni). Questa classe di enzimi è responsabile della maggior parte delle reazioni di ossidazione a livello epatico. La loro funzione è quella di trasformare diverse sostanze endogene o esogene; ogni forma di citocromo ha una sua specificità per quanto riguarda la sostanza da ossidare. I geni che codificano per questi enzimi sono chiamati CYP. Nell’uomo sono stati identificati 57 CYP che sono suddivisibili in 18 famiglie e 42 sub-famiglie in base alla percentuale di sequenze aminoacidiche identiche.

Polimorfismi sui geni dei citocromi P-450 possono portare alla sintesi di enzimi con attività diverse, in grado di metabolizzare più o meno velocemente i farmaci, portando ad un loro accumulo, nel caso di un metabolizzatore lento, oppure alla loro eliminazione troppo rapida dal circolo sanguigno, nel caso di un metabolizzatore rapido.

Lo studio delle varianti genetiche dei CYP è estremamente importante per valutare correttamente la risposta ai farmaci e la loro tossicità, in quanto molti prodotti oggi in commercio sono substrati di questi enzimi. Tali varianti alleliche sono responsabili dell’aumento nella risposta e nella tossicità di farmaci delle classi più disparate (ad es. anticoagulanti, statine, immunosoppressori) o della diminuita risposta di profarmaci, come la codeina (che deve essere metabolizzata a morfina per svolgere la sua azione analgesica) ed altri oppiacei. Di conseguenza, l’attività analgesica dei farmaci è ridotta o assente nei metabolizzatori lenti.

Queste variazioni nella farmacocinetica possono causare, effetti secondari indesiderati. Conoscere a priori quale polimorfismo presenta un paziente è utile nella scelta del farmaco oppure nel dosaggio dello stesso, in modo da ottenere il miglior effetto terapeutico, evitando spiacevoli effetti secondari<sup>30</sup>.

Le reazioni di fase II del metabolismo del farmaco, invece, comprendono reazioni di coniugazione, mediate da diversi enzimi e cofattori, che aggiungono gruppi funzionali ai prodotti di fase I o altri composti allo scopo di renderli più facilmente eliminabili; le principali reazioni di fase II sono la coniugazione con acido glucuronico, l'acetilazione, la coniugazione con amminoacidi (soprattutto glicina, taurina e glutammina), la solfatazione e la metilazione.

#### 4.0 NUOVI ANTICOAGULANTI ORALI (NAO): FARMACOCINETICA E FARMACODINAMICA

La ricerca farmacologica e clinica è indirizzata verso lo sviluppo e la verifica dell'efficacia di nuovi agenti anticoagulanti, concentrando l'interesse verso molecole in grado di bloccare singoli e specifici step della cascata coagulativa, in particolare la trombina (fattore IIa) e il fattore Xa.

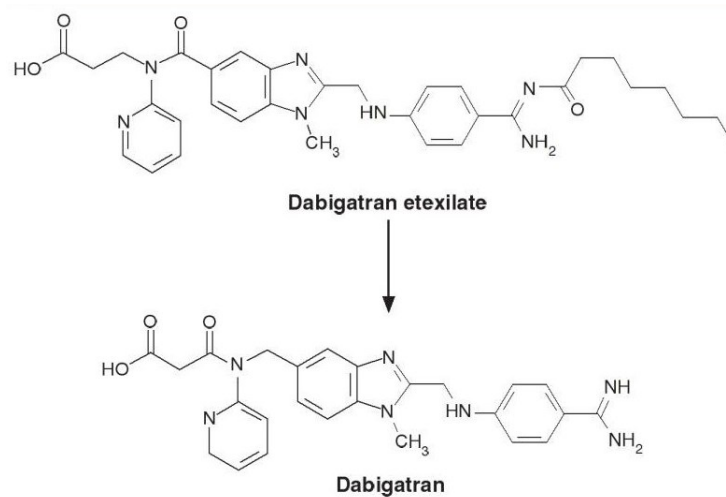
- ✓ Gli inibitori diretti della trombina agiscono modulando la trasformazione del fibrinogeno in fibrina e inibiscono l'attivazione trombotica mediata dai fattori V, VII, XI, XII con effetto anticoagulante; il blocco della trombina determina un'inibizione anche dei suoi effetti recettore-mediati ovvero l'aggregazione piastrinica. Il primo principio attivo per uso orale sperimentato è stato lo *ximelagatran*, ritirato dal mercato dopo 20 mesi per tossicità epatica; la vera svolta è arrivata con la sperimentazione del *dabigatran*.
- ✓ Gli inibitori del fattore Xa agiscono riducendo la formazione di trombina a monte, ma non bloccano la trombina circolante, le cui tracce possono intervenire nell'emostasi conferendo a questa strategia terapeutica un profilo di sicurezza maggiore circa il rischio emorragico. Risultati promettenti sono stati ottenuti con la sperimentazione di *rivaroxaban* e *apixaban*.

##### 4.1. DABIGATRAN

Il dabigatran etexilato è un anticoagulante orale a struttura non peptidica di origine sintetica, è un pro-farmaco<sup>31-33</sup>. Questo nuovo farmaco ha dimostrato di possedere un effetto anticoagulante prevedibile e non necessita di un continuo monitoraggio. Presenta, inoltre, una rapida insorgenza d'azione e una rapida fine dell'effetto, non rendendo necessario in questo modo un trattamento iniziale con anticoagulanti iniettabili, come invece accade per il warfarin.

Farmacocinetica. Il dabigatran etexilato dopo somministrazione orale è rapidamente assorbito e convertito in dabigatran mediante idrolisi catalizzata da esterasi plasmatiche ed epatiche<sup>34</sup> (fig.6). La biodisponibilità assoluta di dabigatran etexilato dopo somministrazione orale è pari a circa il 6.5%<sup>35</sup>.





**Fig.6:** Reazione di idrolisi del Dabigatran etexilato a Dabigatran

Il dabigatran ha azione rapida, con un picco di concentrazione plasmatica dopo circa 2 ore dalla somministrazione orale e un'emivita rispettivamente di 8 ore dopo somministrazione di una dose singola e di 12-14 ore dopo somministrazioni ripetute, indipendentemente dalla dose. Presenta, inoltre, una bassa affinità di legame alle proteine plasmatiche (34-35%) indipendente dalla concentrazione. La scarsa entità del legame con le proteine plasmatiche rende l'effetto anticoagulante più prevedibile e direttamente correlato alla sua concentrazione plasmatica. Infatti, esiste una chiara e lineare correlazione tra la concentrazione plasmatica di dabigatran e l'entità dell'effetto anticoagulante, sulla base dei dati degli studi di fase II. Il volume di distribuzione, pari a 60-70 l, supera il volume dei fluidi corporei totali indicando una moderata distribuzione tissutale. La C<sub>max</sub> e l'area sotto la curva concentrazione plasmatica-tempo (AUC), misurate in soggetti sani e anziani, sono proporzionali alla dose e mostrano un calo biesponenziale con un'emivita media terminale di 11 ore<sup>36</sup>. Agenti che aumentano il pH gastrico, come gli antiacidi o inibitori della pompa protonica (IPP), possono portare a minore esposizione del farmaco. Infatti, l'assorbimento dello stesso richiede un pH acido perché esso è scarsamente solubile ad un pH > 4; pertanto, antiacidi o IPP devono essere somministrati almeno due ore dopo l'assunzione di dabigatran<sup>34</sup>.

La co-somministrazione dell'anticoagulante con un pasto ricco di grassi può ritardare in modo significativo il tempo necessario per raggiungere la C<sub>max</sub>, tuttavia non ha

alcun effetto significativo sulla biodisponibilità, sull'AUC o sulla concentrazione plasmatica, per tale ragione può essere assunto con o senza cibo<sup>34</sup>.

Dabigatran etexilato e dabigatran non sono metabolizzati dal sistema del citocromo P450, non hanno effetti in vitro sugli enzimi umani di questo citocromo e, quindi, non sono attese interazioni imputabili a tale sistema. Ciò è stato confermato da studi in vivo effettuati su volontari sani, in cui non è stata evidenziata alcuna interazione tra dabigatran e atorvastatina (substrati di CYP3A4 e P-gp) e diclofenac (CYP2C9)<sup>34</sup>. Il pro-farmaco (dabigatran etexilato) risulta, invece, substrato del trasportatore d'efflusso glicoproteina P (P-gp). Per questo motivo le eventuali interazioni con potenti induttori (rifampicina, carbamazepina) o inibitori (amiodarone, claritromicina, chinidina) delle P-gp riguardano l'assorbimento del pro-farmaco. La co-somministrazione con verapamil, un inibitore della P-gp, determina un aumento variabile sia dell'AUC che della Cmax del dabigatran a seconda della formulazione e della tempistica della somministrazione del verapamil. Tali variazioni risultano meno probabili quando verapamil è somministrato almeno 2 ore dopo la dose dell'anticoagulante. La co-somministrazione con altri inibitori della P-gp, amiodarone, claritromicina o chinidina determina un modesto incremento della curva concentrazione plasmatica tempo, ma non comporta alcuna modifica dei livelli di assorbimento, della Cmax, del Tmax e dell'emivita. E' controindicata, invece, la co-somministrazione con altri inibitori della P-gp come il dronedarone, il ketoconazolo, l'itraconazolo, la ciclosporina ed il tacrolimus. La concomitante somministrazione di potenti induttori della P-gp (rifampicina, carbamazepina e fenitoina) può ridurre le concentrazioni plasmatiche del dabigatran<sup>37,38</sup>. Nel caso della rifampicina la concomitante somministrazione dovrebbe essere evitata. Per prevenire comunque, le variazioni della concentrazione plasmatica di dabigatran nel caso di co-somministrazione con i farmaci potenti induttori o inibitori della P-gp è opportuno somministrare l'anticoagulante almeno 2 ore prima degli altri farmaci. Si raccomanda cautela per l'uso concomitante con antiaggreganti piastrinici, in quanto questi farmaci comportano un effetto anticoagulante additivo. Inoltre i pazienti devono essere strettamente monitorati per segni e sintomi di sanguinamento<sup>34</sup>.

Dabigatran è eliminato principalmente immodificato attraverso le urine e l'escrezione renale rappresenta l'80% della sua clearance totale. Il restante 20% del

farmaco è coniugato con acido glucuronico per formare glicuronidi acilici, che sono prevalentemente escreti mediante la bile.

Una ridotta funzionalità renale aumenta l'esposizione al dabigatran e prolunga la sua emivita oltre le 12-17 h. Motivo per il quale, pazienti con insufficienza renale moderata (CrCl 30-50 ml/min) mostrano un aumento dell'AUC, rispetto ai soggetti sani, di 3.2 volte; in pazienti con grave insufficienza renale si ha un incremento di 6.3 volte dell'AUC e un raddoppio dell'emivita (28h) rispetto ai soggetti sani. Per queste ragioni, si raccomanda una dose totale giornaliera di 150 mg, da somministrare in due dosi da 75 mg, in pazienti che presentano disfunzione renale moderata e nei soggetti ad elevato rischio di sanguinamento, inclusi pazienti anziani (75-80 anni di età). In pazienti con insufficienza renale grave (CrCl < 30 ml/min), la somministrazione di dabigatran etexilato è controindicata<sup>34,38</sup>.

Farmacodinamica. Il dabigatran, il cui nome commerciale è Pradaxa<sup>39</sup>, è un inibitore non peptidico a basso peso molecolare (723.86 Da come sale mesilato e 627.75 Da come base libera) del FIIa, al cui sito catalitico si lega in modo diretto, competitivo (K<sub>i</sub> = 4.5 nM) e reversibile. Poiché la trombina (proteasi della serina) consente la conversione del fibrinogeno in fibrina nella cascata della coagulazione, la sua inibizione previene la formazione di fibrina e, quindi, dei trombi. Dabigatran inibisce la trombina libera e la trombina legata a fibrina e, ad una concentrazione doppia (K<sub>i</sub>=10 nM), anche l'aggregazione delle piastrine indotta dalla trombina. Inoltre inibisce l'attivazione mediata dalla trombina dei fattori V, VIII, XI e XIII. Il dabigatran è una molecola idrofila e zwitterionica, che non essendo assorbita dopo somministrazione orale è stata resa più lipofila come dabigatran etexilato. Studi pre-clinici *in vivo* hanno dimostrato l'efficacia antitrombotica e l'attività anticoagulante di dabigatran dopo somministrazione endovenosa e di dabigatran etexilato dopo somministrazione orale in vari modelli animali di trombosi<sup>34</sup>.

Dabigatran prolunga il tempo di trombina diluito (dTT) e il tempo di coagulazione da ecarina (ECT), in modo concentrazione-dipendente. L'aPTT viene prolungato in maniera che non riflette linearmente la concentrazione di farmaco attivo ed è dipendente dal tipo di tromboplastina utilizzata<sup>40</sup>.

Dati di sicurezza. In relazione al meccanismo di azione comune a tutti gli anticoagulanti le reazioni avverse più comuni sono i sanguinamenti. Nello studio RE-

LY (*Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy*), che ha più lungo follow-up, le incidenze di emorragie gravi (*major bleeding*) erano per 110 mg: 2.87%/anno e per 150 mg: 3.32%/anno. Sono stati riportati anche disturbi gastrointestinali (nausea, dispepsia, dolore addominale e diarrea) in parte riconducibili alla presenza di acido tartarico tra gli eccipienti ed alterazioni della funzionalità epatica. Inoltre, lo studio RE-LY ha mostrato un aumento del rischio relativo di infarto del miocardio nei pazienti trattati con dabigatran rispetto al warfarin. Un successivo report con un follow-up esteso dello studio invece mostrava che questo aumento del rischio sembra essere trascurabile<sup>38</sup>. Un recente report è stato rilasciato dalla Food and Drug Administration (FDA) in merito al rischio di emorragie gravi associato all'assunzione dei due anticoagulanti, dabigatran etexilato e warfarin, alla luce dei risultati ottenuti dal programma Mini-Sentinel. La FDA esamina la frequenza di sanguinamento gastrointestinale e intracranico, in pazienti in trattamento con dabigatran o warfarin ed emerge che pazienti in terapia con warfarin manifestano un'incidenza di eventi emorragici (emorragie gastrointestinali e intracraniche) da 1.9 a 1.6 volte più alto rispetto al dabigatran etexilato. Questi dati confermano la sicurezza del dabigatran e i notevoli benefici del nuovo anticoagulante orale, utilizzando il regime terapeutico approvato<sup>41</sup>.

#### 4.2. RIVAROXABAN

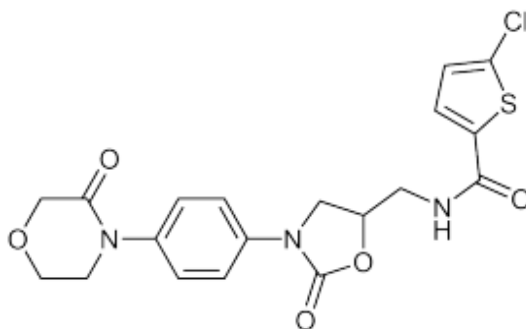
Il rivaroxaban è un inibitore orale diretto del fattore Xa utilizzato per la prevenzione ed il trattamento dei disturbi tromboembolici. Questo farmaco inibisce competitivamente sia il fattore Xa libero sia il fattore Xa legato al coagulo<sup>42,43</sup>. Contrariamente all'eparina (inibitore indiretto del fattore Xa), il rivaroxaban per esercitare la sua azione inibitoria sul fattore Xa, non richiede la presenza dell'antitrombina<sup>44-46</sup>. L'importanza di questa differenza è stata dimostrata attraverso studi in cui è stato osservato che l'antitrombina proteggeva dall'inibizione il fattore Xa, legato nel complesso con la protrombinasi<sup>47-49</sup>.

Farmacocinetica. Rivaroxaban ha un'elevata biodisponibilità (80-100%) a seguito della somministrazione orale; dosaggi  $\geq 15$  mg presentano a digiuno un assorbimento ridotto che viene ripristinato in seguito ad assunzione associata al cibo, per questo motivo tali dosaggi devono essere ingeriti ai pasti. Ha una rapida insorgenza

d'azione, raggiunge la massima concentrazione plasmatica (Cmax) 3-4 h dalla somministrazione orale, la sua emivita è di 5-9 h in soggetti sani e di 11-13 h in soggetti anziani allo steady state<sup>45,50</sup>.

Si lega per il 92-95% alle proteine plasmatiche, un volume di distribuzione di 50 L con una bassa affinità tissutale extravascolare. Non sono descritti fenomeni di accumulo dopo dosi ripetute. Ha una duplice modalità di eliminazione: 2/3 sono metabolizzati dal fegato, 1/3 viene escreto non modificato dal rene sia per filtrazione glomerulare che attraverso trasporto attivo mediato da P-gp e da *breast cancer resistance protein* (BCRP)<sup>50,51</sup>.

Nel fegato il rivaroxaban viene indipendentemente biotrasformato dai citocromi CYP3A4, 3A5 e 2J2 e non sono noti metaboliti attivi generati nella biotrasformazione<sup>51,52</sup> (fig.7).



**Fig.7** Struttura del Rivaroxaban

La sua farmacocinetica mostra una bassa variabilità intra- e inter-individuale e non è pertanto necessario un monitoraggio dei livelli di anticoagulazione di routine. Non sono note interazioni maggiori con alimenti o farmaci quali digossina, antiacidi, atorvastatina, inibitori di pompa protonica (PPI). Tuttavia, sostanze con azione inibitoria combinata di CYP3A4, P-gp e BCRP quali molti antifungini azolici sistemici (es. ketoconazolo) e gli inibitori di proteasi (HIV), aumentano significativamente le concentrazioni del farmaco e il rischio emorragico, per cui sono controindicati. Il fluconazolo (moderato inibitore del solo CYP3A4), eritromicina e claritromicina sembrano avere un'interazione clinicamente non rilevante<sup>52</sup>. La Cmax del farmaco appare aumentata in soggetti gravemente sottopeso (<50 kg), con insufficienza renale grave (CrCl <30 ml/min) e/o molto anziani (>80 anni)<sup>50</sup>. Dal punto di vista clinico non è necessario aggiustare la dose in funzione di tali

parametri, ad esclusione dei pazienti a rischio di ictus in seguito a fibrillazione atriale con CrCl 30-49 ml/min, i quali devono assumere 15 mg/die in modo da avere la stessa esposizione al farmaco del dosaggio pieni di 20 mg/die<sup>54</sup>.

Farmacodinamica. Rivaroxaban il cui nome commerciale è Xarelto, è un inibitore orale, diretto, competitivo, selettivo del FXa, sia libero che legato a fibrina, e del complesso protrombinasico<sup>55,56</sup>.

Il suo meccanismo di azione è quindi indipendente dal legame con l'antitrombina. E' una piccola molecola (PM 436Da) che lega direttamente ad alta affinità e selettività il sito attivo del FXa come indicato da valori di Ki nel basso nM ( $0.4 \pm 0.02$  nmol/L), con IC<sub>50</sub> di 0.7 nmol/L per FXa, mentre le IC<sub>50</sub> per altre proteasi incluse FVIIa, XIa, IIa, IXa, proteina C attivata, plasmina, urokinasi e tripsina sono >20000 nM<sup>56,57</sup>.

Esercita anche attività inibitoria competitiva del fattore protrombinasico con IC<sub>50</sub> di 2.1 nmol/L, simili ai valori per l'attività anti FXa. Inoltre, inibisce il FXa legato al trombo con IC<sub>50</sub> di 75 nM. L'aPTT è poco sensibile e specifico per il rivaroxaban, il PT se determinato usando la Neoplastina ha una buona correlazione con la concentrazione di farmaco libero, mentre altri reattivi hanno sensibilità e specificità inferiore<sup>58</sup>.

I test cromogenici anti-Xa calibrati con questo farmaco hanno comunque la correlazione lineare più alta e quindi la sensibilità e specificità più elevata con le concentrazioni di farmaco plasmatico, riflettendone meglio la farmacodinamica rispetto al PT<sup>59</sup>.

Dati di sicurezza. Come tutti i farmaci anticoagulanti, gli eventi avversi più frequenti sono associati al suo meccanismo di azione, ovvero sono le complicanze emorragiche di vario grado, occulte o clinicamente evidenti. Il rischio emorragico è aumentato in pazienti con ipertensione arteriosa non controllata farmacologicamente, o che assumano regolarmente FANS, antiaggreganti piastrinici o con diatesi emorragiche acquisite o congenite. Il rischio emorragico è funzione anche della dose e del tempo di esposizione. Nello studio ROCKET-AF (*Rivaroxaban Once daily oral direct Factor Xa inhibition Compared with vitamin K antagonism for prevention of stroke and Embolism Trial in Atrial Fibrillation*) in pazienti con fibrillazione atriale non valvolare e follow up relativamente lungo, l'incidenza di emorragie maggiori o clinicamente rilevanti era del 14.9%/anno paragonabili al braccio standard del

warfarin (14.5%/anno HR 1.03). Non sono note a tutt'oggi tossicità organo-specifiche. E' controindicato in gravidanza ed in allattamento, anche sulla base di studi pre-clinici nei roditori.

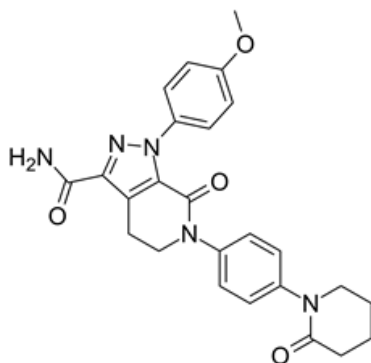
#### 4.3. APIXABAN

L'apixaban è un inibitore orale diretto, competitivo, reversibile e selettivo del FXa, con una selettività per tale fattore 30.000 volte superiore rispetto alle altre proteasi della cascata coagulativa (trombina, tripsina, proteina C)<sup>60</sup>. Rispetto al suo predecessore (razaxaban), l'apixaban presenta un miglior profilo farmacocinetico<sup>61</sup>.

Farmacocinetica. Studi di farmacocinetica hanno dimostrato una buona biodisponibilità orale, con assorbimento di circa il 50% della dose somministrata<sup>62,63</sup>. La biodisponibilità orale non è influenzata dalla contemporanea assunzione di cibo, né da pasti ricchi in grassi e/o calorie<sup>64</sup>.

In aggiunta, date le proprietà fisico-chimiche dell'apixaban, l'assorbimento del farmaco non è influenzato dai farmaci in grado di modificare il pH gastrico<sup>65</sup>.

Dopo la somministrazione l'apixaban viene rapidamente assorbito nel tratto distale dell'intestino tenue e nel colon ascendente<sup>63</sup>, raggiungendo il picco di concentrazione plasmatica dopo circa 3h<sup>64</sup>. L'emivita di questo farmaco è 8-15 h<sup>64</sup> e lo *steady state* viene raggiunto intorno al terzo giorno, con modesto accumulo. In circolo, la frazione legata alle proteine plasmatiche è pari all'87%<sup>66</sup> e il volume di distribuzione è pari a 21 litri<sup>64</sup> (Fig.8).



**Fig.8** Struttura dell' Apixaban

L'apixaban viene metabolizzato a livello epatico tramite il sistema del citocromo P450 (principalmente CYP3A4 e CYP3A5)<sup>67</sup>. L'escrezione avviene per via renale, via biliare e via intestinale diretta<sup>66-71</sup>.

L'escrezione renale del farmaco rappresenta il 27% della clearance totale ed avviene attraverso trasporto attivo mediato dalla P-gp e dalla BCRP<sup>63</sup>.

Data la farmacocinetica dell'apixaban, ne è sconsigliata la contemporanea assunzione con potenti inibitori duali del citocromo CYP3A4 e della P-gp, quali antimicotici (ketoconazolo, itraconazolo, voriconazolo) o antiretrovirali (ritonavir). Analogamente, si sconsiglia la contemporanea assunzione di induttori del citocromo CYP3A4 e della P-gp (rifampicina, fenitoina, carbamazepina, erba di San Giovanni)<sup>63</sup>. Questi farmaci potrebbero notevolmente incrementare o ridurre l'esposizione al farmaco.

Particolare attenzione va riservata ai pazienti con stadi avanzati di patologie epatiche e renali ed una riduzione del dosaggio del farmaco è opportuna in presenza di almeno due delle seguenti condizioni: età > 80 anni, peso corporeo < 60 kg e creatinina sierica > 1.5 mg/dl<sup>72</sup>.

Farmacodinamica. L'apixaban il cui nome commerciale è Eliquis ha proprietà farmacodinamiche che riflettono il suo meccanismo di azione. Studi in vitro condotti utilizzando plasma povero di piastrine da volontari sani hanno dimostrato che l'apixaban è un inibitore altamente selettivo del sito attivo del FXa ( $K_i = 0.08$  nM), con minima affinità ( $K_i \sim 3 \mu\text{M}$ ) nei confronti della trombina, della callicreina plasmatica e della chimotripsina. E' stata inoltre riscontrata una blanda affinità nei confronti della tripsina e di altre serin-proteasi note<sup>60</sup>.

Come conseguenza dell'inibizione diretta del FXa, l'apixaban interferisce in maniera selettiva e reversibile con la cascata coagulativa, determinando un allungamento dei tempi della coagulazione (INR/PT e aPTT). Tuttavia le modifiche osservate in questi test di coagulazione alle dosi terapeutiche previste sono di lieve entità e soggette ad un alto grado di variabilità. Questi test non sono pertanto raccomandati per valutare gli effetti farmacologici dell'apixaban<sup>72</sup>. L'attività anti-FXa esibisce un rapporto lineare diretto con la concentrazione plasmatica del farmaco, come evidenziato dalla riduzione dell'attività enzimatica del FXa in molteplici test commerciali che



mostrano tutti elevata specificità e sensibilità ed anche una buona riproducibilità usando il farmaco specifico come calibrante<sup>59</sup>.

E' importante sottolineare che l'apixaban non ha effetti diretti sull'aggregazione piastrinica e che la sua azione è indipendente dal legame all'antitrombina<sup>64</sup>.

Dati di sicurezza. Molte delle informazioni sulla sicurezza di apixaban derivano da due studi di fase III sulla prevenzione del VTE in pazienti sottoposti a chirurgia maggiore per artroprotesi di ginocchio (ADVANCE-2) (Apixaban Dose Orally Vs. ANtiCoagulation with Enoxaparin 2) o di anca (ADVANCE-3)<sup>68</sup>. In entrambi questi studi, apixaban è stato somministrato alla dose di 2.5 mg due volte al giorno e confrontato con enoxaparina.

Come con altri anticoagulanti, anche durante terapia con apixaban possono verificarsi sanguinamenti, specialmente in presenza di fattori di rischio concomitanti. L'analisi congiunta dei due studi ADVANCE ha consentito di evidenziare che i sanguinamenti maggiori si sono verificati nello 0.7% dei soggetti che ricevevano apixaban e nello 0.8% di coloro che ricevevano enoxaparina. Risultati analoghi si ottengono analizzando insieme le emorragie maggiori e quelle clinicamente rilevanti (4.4% in coloro che assumevano apixaban vs 4.9% in coloro che assumevano enoxaparina). In aggiunta, nello studio di fase III ARISTOTELE<sup>69</sup> sulla prevenzione dell'ictus cardioembolico, apixaban 5 mg/bis die ha determinato un numero di sanguinamenti maggiori significativamente inferiore rispetto a warfarin (2.13%/anno vs 3.09%/anno,  $p < 0.001$ ).

Oltre alle manifestazioni emorragiche, si sono riscontrate anche altre reazioni avverse che, sulla base della frequenza, sono state classificate come comuni, non comuni e rare.

## 5.0 RAZIONALE DELLO STUDIO

Verificare l'influenza del background genetico di ciascun individuo sul metabolismo, assorbimento ed effetto terapeutico dei nuovi anticoagulanti orali così come è stato precedentemente analizzato per il warfarin.

L'obiettivo preposto è stato raggiunto mediante analisi di polimorfismi su geni coinvolti nel processo metabolico del Dabigatran, Rivaroxaban e Apixaban al fine di predirne l'efficacia terapeutica e la tollerabilità individuale<sup>73</sup>.

La variabilità inter-individuale ad un trattamento farmacologico costituisce da sempre uno dei problemi più importanti osservati nella gestione dei pazienti da parte del clinico. Questa variabilità in passato è stata attribuita principalmente all'influenza di fattori fisiologici e patologici, come ad esempio l'età, il sesso, lo stato nutrizionale, la funzionalità renale ed epatica, le abitudini di vita (con particolare riferimento alla dieta e all'abuso di alcool e fumo) ed, inoltre, alla concomitante assunzione di altri farmaci o alla presenza di comorbidità.

Attualmente, come ampiamente dimostrato da studi effettuati nell'ultimo decennio, la risposta ai farmaci è una condizione multifattoriale, che dipende dall'interazione tra i fattori sopra menzionati (ambientali) e i fattori genetici. Un'insufficiente risposta ad un trattamento farmacologico può provocare un fallimento parziale o totale della terapia in atto, effetti collaterali e reazioni avverse gravi e talvolta fatali.

Per quanto riguarda gli anticoagulanti orali, l'influenza dei fattori genetici nella risposta al trattamento terapeutico è stata dimostrata da numerosi studi presenti in letteratura. Molto poco, invece, è stato elaborato nei confronti dei NAO per i quali ad oggi è stato pubblicato un solo lavoro ad opera di *Parè et al., Circulation 2013*, in riferimento all'effetto del background genetico sul metabolismo individuale del dabigatran. Non esistono, invece, studi relativi ai NAO più recenti, quali rivaroxaban e apixaban.

Sulla base di questi dati estrapolati da studi scientifici e considerando l'importanza di ampliare le conoscenze sulle basi molecolari degli effetti di questi farmaci in relazione ad una maggiore efficacia terapeutica di questi farmaci, abbiamo elaborato un'ipotesi di studio per confermare ed eventualmente approfondire, nella nostra popolazione, l'influenza della costituzione allelica sulla risposta del dabigatran

mediante dosaggio plasmatico e di ampliare questa analisi anche a pazienti che assumono rivaroxaban e apixaban.

## 6.0 MATERIALI E METODI

Il progetto per questo triennio di dottorato è stato suddiviso in sei fasi:

- sottomissione del progetto e approvazione di questo da parte del comitato etico degli Ospedali Riuniti di Foggia;
- arruolamento di pazienti in terapia anticoagulante, firma del consenso informato e successivo prelievo di sangue venoso;
- conservazione del materiale biologico e allestimento di un database per l'inserimento dei dati;
- dosaggio dei farmaci a livello plasmatico, precedentemente raccolto, mediante spettrometria di massa;
- analisi genetica dei polimorfismi selezionati, mediante tecniche molecolari;
- analisi statistica dei dati ottenuti dall'indagine genetica e dall'indagine in spettrometria di massa.

### *6.1. Caratteristiche cliniche e farmacologiche dei pazienti*

Durante il I e II anno di questo dottorato sono stati arruolati presso il Servizio di Ematologia della ASL di FG, diretto dal Dott. Matteo Buono, il Centro Emostasi e Trombosi degli Istituti Ospedalieri di Cremona, diretto dalla Prof.ssa Sophie Testa, il Servizio di Cardiologia degli OO.RR. di FG, diretto dal Prof. Matteo Di Biase, 222 pazienti in trattamento con i nuovi anticoagulanti orali da almeno 3 mesi, così suddivisi:

- 92 pazienti in trattamento con Dabigatran,
- 51 pazienti in trattamento con Rivaroxaban
- 79 pazienti in trattamento con Apixaban.

Dopo firma del consenso informato è stata compilata una scheda con i dati anagrafici (Fig.7) e raccolta la storia anamnestica di ciascuno, includendo informazioni come abitudini alimentari del paziente, assunzione di farmaci, presenza di altre malattie, complicanze emorragiche, interventi chirurgici.

A completamento delle notizie cliniche di ciascuno, sono stati richiesti esami di laboratorio, comprendenti la funzionalità renale, la clearance della creatinina, oltre

che ad emocromo completo, GOT, GPT e gammaGT, Bilirubina totale e Bilirubina frazionata, utili per avere un quadro generale e completo dello stato di salute di ciascun individuo arruolato.

**SCHEDA ANAMNESTICA**  
(Studio Farmacogenetico NAO)

Data raccolta informazioni: \_\_\_\_\_ tel: \_\_\_\_\_

COGNOME	
NOME	
Data e luogo di nascita	
Professione	
Titolo di studio	
Origini etniche	
Pressione arteriosa	Peso:
Gruppo Sanguigno	Altezza:
Fumatore	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> se SI quante sigarette al di: nr. _____ Se Ex _____ <small>(quando ha smesso e quante ne fumava)</small>
Fa uso di bevande alcoliche	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> se SI quale tipo di bevanda alcolica e in che quantità al di: _____

PATOLOGIA (indicazione alla terapia anticoagulante) \_\_\_\_\_  
 Trombocitopenia o disturbi funzionalità piastrinica? \_\_\_\_\_  
 PT (+INR) e PTT (+RATIO) (valori e data) \_\_\_\_\_  
 Fibrinogeno (valore, indicare se in terapia anticoagulante) \_\_\_\_\_  
 Data di manifestazione e data di diagnosi della FANV o del TEV \_\_\_\_\_

Se FANV, indicare SCORE CHADS o CHADS VASC \_\_\_\_\_  
 Ha fatto uso di Coumadin o Syntrom? SI  NO   
 Se SI, specificare quale dei due \_\_\_\_\_  
 > indicare la posologia (mg/settimana) \_\_\_\_\_  
 Fa uso di farmaci anticoagulanti di nuova generazione (NAO)? SI  NO   
 > se SI indicare quale e data di inizio della terapia \_\_\_\_\_  
 > indicare l'ora dell'ultima assunzione del farmaco \_\_\_\_\_  
 Posologia (mg/die) \_\_\_\_\_  
 Indicare se ha fatto uso di antibiotici nell'ultima settimana \_\_\_\_\_

Fa uso di antiaggreganti (ASA, clopidogrel....) SI  NO   
 > se SI indicare quale e data di inizio \_\_\_\_\_  
 Ha problemi di gastrite o di reflusso gastroesofageo? SI  NO   
 Altre Patologie \_\_\_\_\_  
 Diabete SI  NO   
 > se SI specificare il tipo di diabete \_\_\_\_\_  
 Coronaropatie SI  NO   
 Progresso Infarto del miocardio SI  NO   
 > se SI indicare la data \_\_\_\_\_  
 Eventi emorragici SI  NO   
 > se SI indicare la data dell'evento: \_\_\_\_\_  
 > indicare la tipologia dell'evento emorragico \_\_\_\_\_  
 se l'emorragia si è arrestata da sola  
 se è stata necessaria l'ospedalizzazione  
 se è stata necessaria la trasfusione  
 Eventi Trombotici SI  NO   
 > se SI specificare la tipologia di evento \_\_\_\_\_  
 Interventi chirurgici SI  NO   
 > se SI quali? \_\_\_\_\_  
(specificare se prima e dopo l'inizio della terapia)  
 Altri farmaci attualmente utilizzati \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 Familiarità di primo grado per ICTUS ISCHEMICO o EMORRAGICO (specificare) \_\_\_\_\_  
 Gravidanze SI  NO   
 • Numero parti \_\_\_\_\_  
 • modalità parto \_\_\_\_\_  
 • settimane gestazione \_\_\_\_\_  
 Aborti SI  NO   
 • Numero aborti \_\_\_\_\_  
 • settimane gestazione \_\_\_\_\_

**Fig.7** Scheda dati anagrafici paziente

## 6.2. Dosaggio del farmaco mediante spettrometria di massa

Per il dosaggio del farmaco è stato eseguito un doppio prelievo di sangue venoso: il primo a 12 ore dall'ultima somministrazione del farmaco e il secondo dopo circa 2 ore dall'assunzione dello stesso.

Il materiale ematico è stato raccolto in provette di sodio-citrato e immediatamente centrifugato a 3000 rpm per 10'. Il plasma è stato prelevato, aliquotato e immediatamente congelato a -80°C, la parte corpuscolata, invece, è stata risospesa in soluzione fisiologica (NaCl 0.9%) e conservata ad una temperatura di -20°C per la successiva purificazione del DNA.

Stesso procedimento per il secondo prelievo eseguito entro le 3 ore dall'assunzione del farmaco.

Sul plasma, precedentemente raccolto nella fase *pre- e post-assunzione* del farmaco, è stata dosata la concentrazione attraverso una tecnica combinata HPLC-spettrometria di massa presso il laboratorio di Emostasi e Trombosi dell'IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, diretto dalla Dott.ssa Elvira Grandone.

✓ Spettrometro di massa

La spettrometria di massa è una metodica che consente l'identificazione e l'analisi quantitativa di una molecola a partire dalla sua massa.

Tale tecnica sfrutta due fenomeni correlati alla massa ( $m$ ) ed alla carica ( $z$ ):

- 1) la traiettoria di uno ione o di una particella carica in movimento può essere modificata per azione di un campo magnetico od elettrico, e l'entità della deviazione è funzione del rapporto  $m/z$  della particella: a parità di carica, particelle di massa minore subiranno deviazione maggiore.
- 2) ioni o particelle cariche, accelerati da un campo elettrico, assumono velocità diverse in dipendenza della loro massa: a parità di carica, particelle di massa maggiore assumono velocità minore.

Le tappe fondamentali del processo d'analisi sono:

1. ionizzazione delle molecole in esame, cioè la trasformazione in uno o più ioni, in genere con carica positiva;
2. accelerazione degli ioni per immissione in un campo elettrico;
3. separazione degli ioni con massa diversa;
4. rivelazione dei diversi ioni formati e la conseguente determinazione della loro massa.

Affinché si possano realizzare, lo spettrometro di massa deve essere dotato di almeno 4 componenti:

- 1) camera di ionizzazione per produrre ioni;
- 2) un campo elettrico per accelerare gli ioni prodotti;
- 3) un analizzatore di massa, che utilizzando un campo magnetico e/o un campo elettrico, separa gli ioni di massa diversa;

- 4) un rivelatore, che raccoglie gli ioni generando un impulso quantificabile e registrabile.

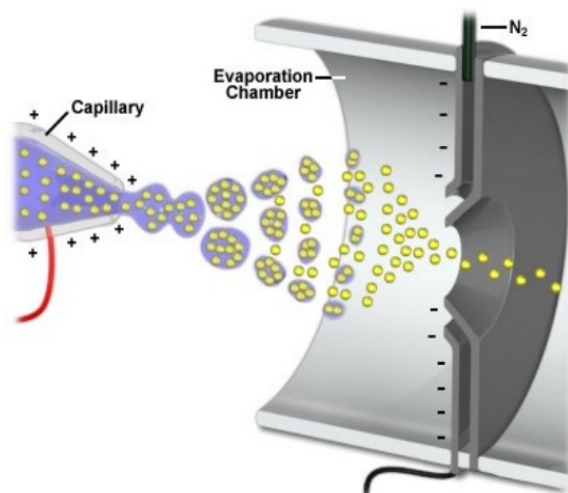
Il campione viene introdotto in una camera da vuoto mediante un opportuno sistema di introduzione, nel nostro caso un sistema HPLC usato come ingresso dello spettrometro di massa, dopo di che viene ionizzato nella camera di ionizzazione e gli ioni prodotti vengono separati nell'analizzatore sulla base del loro rapporto  $m/z$  e raccolti da un rivelatore. Nel rivelatore essi generano un segnale elettrico proporzionale al numero di ioni presenti. Il sistema di elaborazione dati registra questi segnali elettrici in funzione del rapporto  $m/z$  e li converte in uno spettro di massa.

Esistono diverse modalità di ionizzazione, che rappresentano il principale elemento di differenziazione tra le varie metodiche.

Nel nostro caso si è trattato di evaporazione ionica, meglio nota con il termine ESI (Electro Spray Ionization). La peculiarità dell'ESI è il fatto che la ionizzazione avviene a pressione atmosferica e dà origine a ioni multicarica della stessa molecola (ionizzazione positiva). Poiché la separazione avviene in base al rapporto  $m/z$ , aumentando il numero delle cariche  $z$  di uno ione è possibile che molecole di parecchi milioni di dalton rientrino nell'intervallo di massa rilevabile dalla maggior parte degli analizzatori esistenti.

Il campione, sciolto in una miscela acqua/solvente volatile (metanolo, acetonitrile o loro miscele), è nebulizzato a pressione atmosferica dentro la camera di ionizzazione attraverso un ago tenuto ad un alto potenziale elettrico.

Le goccioline di spray, che si sono caricate positivamente per azione del campo elettrico, vengono attratte verso una "lente di estrazione di ioni", che grossolanamente è costituito da un capillare mantenuto sotto vuoto e a un potenziale negativo; in tal modo il sovente evapora e gli ioni carichi sono accelerati verso l'analizzatore (fig.8).



**Fig.8** Introduzione del campione nello spettrometro attraverso il capillare

Da un campione è possibile produrre ioni molecolari positivi o negativi a seconda della polarità del voltaggio del capillare e del solvente utilizzato.

Da una stessa molecola si formano molteplici ioni molecolari *ciascuno recante un diverso numero di cariche*, che vengono quindi inviati all'analizzatore sotto vuoto dell'apparecchio: si ottiene così uno spettro in cui i numerosi *picchi adiacenti differiscono tra loro per una unità di carica*, più comunemente un singolo protone.

Il programma computerizzato che gestisce lo spettrometro provvede a calcolare il valore della carica di ogni singolo picco e ciò consente di determinare il valore della massa con una accuratezza superiore a qualsiasi altra tecnica disponibile. Se ne ricava il così detto "spettro deconvoluto" che riporta un unico picco, il cui valore di massa è quello del campione analizzato.

Gli analizzatori di massa hanno la funzione di separare ioni di massa diversa utilizzando un campo magnetico e/o campo elettrico e a seconda della modalità con la quale esplicano la funzione si distinguono in analizzatori:

- a Settore magnetico;
- a Tempo di volo (TOF);
- a **Quadruplo**;
- a Trappola ionica;
- a Risonanza ciclotronica ionica in trasformata di Fourier FT-ICR.

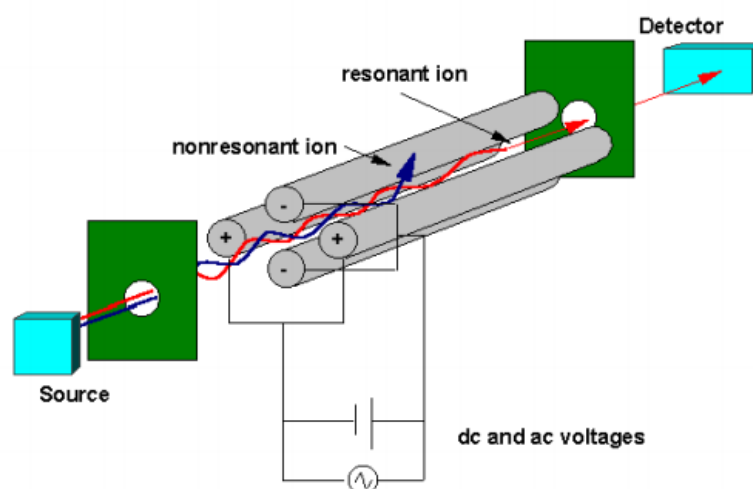
I vari analizzatori differiscono tra loro principalmente per: il massimo rapporto  $m/z$  misurabile; il potere risolutivo; la sensibilità; la velocità di analisi e la facile



utilizzazione se lo spettrometro è interfacciato ad un altro apparecchio (HPLC, GC, EC). Tra questi l'elemento più importante è il *potere risolutivo* che non è altro che la capacità di separare due picchi di massa diversa; ne consegue che all'aumentare del potere risolutivo dell'analizzatore aumenta l'accuratezza della misura che indica di quanto il valore ottenuto o massa misurata si discosta dal valore reale o massa reale, indica cioè l'ampiezza dell'errore insito nella misurazione. L'accuratezza dipende da molteplici fattori connessi alle metodiche seguite nell'analisi per la ionizzazione, la rilevazione, l'acquisizione dei dati, che possono influire singolarmente o congiuntamente sul risultato finale. Per determinare l'accuratezza di un'analisi si effettua una calibrazione con una molecola di cui si conosce la massa esatta.

L'analizzatore da noi utilizzato è a quadrupolo, questo è formato da quattro barre metalliche parallele di 10 – 20 cm di lunghezza poste in una camera sotto vuoto. Le barre hanno sezione circolare od iperbolica e sono disposte a coppie sovrapposte.

Le barre sono collegate sia ad una sorgente di corrente continua, sia ad una sorgente di corrente alternata a radiofrequenza. Ad una coppia di barre diagonalmente opposte è applicato un potenziale positivo, all'altra coppia un potenziale negativo. A tutte e due le coppie è sovrapposta una corrente a RF, ma il voltaggio di RF sovrapposto alle barre negative è tale da trovarsi di  $180^\circ$  fuori fase rispetto alla coppia positiva. La funzione della corrente alternata a radiofrequenza è quella di far variare la polarità ed il voltaggio delle barre, più o meno rapidamente a seconda della frequenza applicata (fig.9).



**Fig.9** Analizzatore a quadrupolo

Il movimento di uno ione che entra nel quadrupolo subisce oscillazioni in quanto viene alternativamente attratto e respinto dalle coppie di barre che variano in continuo il loro potenziale da + a -. Lungo il cammino degli ioni si genera un campo elettrico che varia continuamente, e la traiettoria seguita dagli ioni non è pertanto lineare, ma segue un andamento a spirale.

Solo per certi valori di voltaggio e radiofrequenza gli ioni con un dato valore  $m/z$  mantengono un'oscillazione stabile, escono dall'analizzatore e giungono fino al rivelatore; gli altri, con diverso rapporto  $m/z$  subiranno delle oscillazioni instabili che li porteranno a collidere con le barre del quadrupolo ed ad annullarsi. Una proprietà del quadrupolo è che la massa degli ioni che lo attraversano fino al rivelatore è proporzionale al voltaggio applicato alle barre; pertanto variando voltaggio e RF si ottiene la filtrazione successiva, e quindi l'arrivo al rivelatore, di ioni a massa diversa. Ciò consente la selezione di un particolare ione, oppure la scansione nel campo delle masse tramite la variazione delle tensioni. Se si applica la sola RF tutti gli ioni sono inviati al rivelatore.

Il potere risolutivo di questi analizzatori è nell'ordine di 3.000 e quindi il quadrupolo è da considerarsi un analizzatore a bassa risoluzione; è però meno costoso di un analizzatore a settore magnetico e l'acquisizione di uno spettro avviene in pochi secondi.

L'analizzatore a quadrupolo è quello più frequentemente accoppiato alla ionizzazione per elettrospray, e trova ampia applicazione come sistema di rivelazione nella cromatografia liquida e nella gas cromatografia accoppiate alla spettrometria di massa.

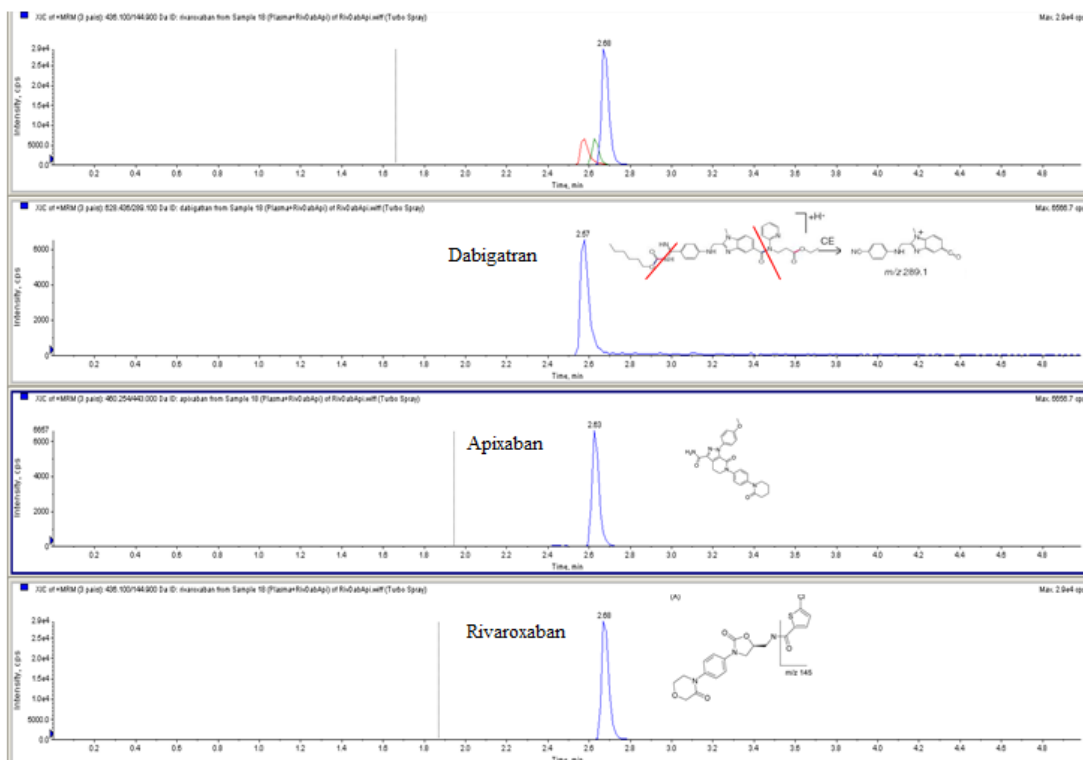
I rivelatori o detectors usati negli spettrometri di massa sono rapportabili a due tipi principali:

- quelli a misura diretta;
- quelli a **moltiplicatore**.

Quello da noi usato è il moltiplicatore elettrico costituito da una serie di elettrodi in cascata. Quando uno ione arriva sul primo elettrodo questo emette un fascio di elettroni che vanno a colpire il secondo elettrodo, il quale a sua volta emette una quantità maggiore di elettroni e così via.

Il risultato è una forte amplificazione del segnale che viene poi digitalizzato ed elaborato infine dal calcolatore dello spettrometro per la presentazione dello spettro di massa.

Lo spettro di massa si presenta quindi come un insieme di linee verticali (*picchi*) di intensità diversa, ciascuna corrispondente al valore di massa di uno ione frammento. In fig.10 sono rappresentati gli spettri di massa relativi ai NAO da noi studiati: Dabigatran, Apixaban e Rivaroxaban.



**Fig.10** Spettri di massa dei 3 farmaci: Dabigatran, Apixaban e Rivaroxaban.

✓ Preparazione e analisi del campione

Per effettuare un'analisi accurata quando si dosa con lo spettrometro di massa, è necessario effettuare una calibrazione con una molecola di cui si conosce la massa esatta.

Nel nostro caso, abbiamo usato per ogni farmaco 3 calibratori differenti (a concentrazione nota) che sono serviti per costruire una retta di taratura così da poter determinare le concentrazioni di farmaco presenti nel plasma dei pazienti sottoposti

allo studio e 2 plasma di controllo specifici anch'essi a concentrazione nota. Il kit usato è Biophen, *Hyphen BioMed, calibration plasma and human plasma at two levels of Dabigatran/Rivaroxaban/Apixaban for the quality control*.

Abbiamo utilizzato come solvente volatile l'acetonitrile, lo stesso in cui abbiamo risospeso l'internal standard (IS). La preparazione del campione da analizzare è stata così eseguita:

- è stato risospeso un volume di 150µl di acetonitrile contenente IS + 50µl di plasma o calibratore;
- è stato vortexato il tutto per qualche secondo;
- è stato centrifugato a 15000 rpm x 5 min;
- è stato iniettato un volume di 80 µl nella Colonna cromatografica: Chromolith FastGradient RP18e 50x2 mm Merck;
- il campione così lavorato è stato introdotto nello spettrometro di massa<sup>74</sup> attraverso il sistema ESI, dove è stato analizzato e rivelato dal sistema API Sciex 3000 (PerkinElmer , Boston, MA , USA).

### 6.3. *Analisi genetica dei polimorfismi*

Come già detto, il nostro scopo è stato quello di verificare come il background genetico di ciascun individuo influenzi il metabolismo, l'assorbimento ed l'effetto terapeutico dei NAO, determinando così un'eterogeneità di risposta agli stessi.

Recentemente sono stati individuati alcuni geni che codificano per proteine coinvolte nella farmacocinetica del dabigatran, in particolare il trasportatore della glicoproteina P che è codificato dal gene ABCB1 (pompa di efflusso ATP-dipendente) e un enzima metabolizzante carbossilesterasi 1 (CES1), che trasforma il dabigatran etexilato in forma attiva.

Per confermare ed approfondire i dati di letteratura, abbiamo ricercato presso il laboratorio di Genetica Medica degli OO.RR. di Foggia, diretto dal Prof. Maurizio Margaglione, le varianti geniche (SNPs) dei geni ABCB1 (rs4148738) (g.184516G>A) e CES1 (rs8192935, rs2244613; rispettivamente g.10282T>C e g.27467C>A) sui pazienti che assumono dabigatran. Considerando che ABCB1 è un gene coinvolto anche nella farmacocinetica del rivaroxaban e apixaban, abbiamo esteso l'analisi genetica anche a pazienti che assumono questi farmaci.

Innanzitutto è stato estratto il DNA dal sangue di ogni paziente con metodica Salting out, successivamente è stata effettuata l'analisi attraverso amplificazione genica dei frammenti genici d'interesse (PCR), grazie a primers specifici per i 3 polimorfismi in studio, è stato osservato il prodotto di PCR su gel di agarosio e, infine, è stato eseguito il sequenziamento diretto per la caratterizzazione molecolare.

✓ Estrazione di DNA da sangue (Salting out)

Per il recupero dell'acido nucleico i pazienti sono stati sottoposti a prelievo di sangue venoso di circa 5 ml in provetta con sodio citrato 3.8% o EDTA.

Il sangue è stato trasferito in una falcon da 50 ml, alla quale sono stati aggiunti 45 ml di una soluzione lisante (*lysis buffer*) costituita da Saccarosio 0.32 M, Tris-HCl 10 mM PH 7.5; MgCl<sub>2</sub> 5mM, Triton X-100 1%. Dopo aver centrifugato la sospensione a 3500 rpm per 10 minuti, è stato eliminato il sovrantante e il pellet ottenuto è stato sottoposto a un doppio lavaggio mediante un baffle di lavaggio (*fisio buffer*) costituito da NaCl 0.075 M, EDTA 0.025 M e successivamente centrifugato a 3500 rpm per recuperare un pellet costituito da acidi nucleici contaminati ancora da materiale proteico e glicoproteico. Quindi, il pellet è stato trattato con 3 ml di un'ulteriore soluzione di lavaggio (*buffer A*) costituito da Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 2 mM, con l'aggiunta di SDS 10% e *Proteinase K* (enzima proteolitico) ed incubato a 65° C per 1 ora.

Al termine dell'incubazione è stato aggiunto 1/6 ( $\approx 5 \mu\text{l}$ ) del volume totale di NaCl 5M per allontanare le proteine ancora presenti. Questo passaggio determina una riduzione della solubilità delle proteine degradate all'interno del solvente e facilita l'aggregazione e la successiva precipitazione dopo centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti (salting out) del DNA.

Il sovrantante, contenente il DNA, è stato trasferito in una falcon sterile, nella quale sono stati precedentemente aggiunti 2 volumi di alcool isopropilico (6ml), si è così reso visibile il DNA sottoforma di nuvola bianca, la cosiddetta "medusa", che è stata prelevata utilizzando una pasteur di vetro, precedentemente chiusa e curvata ad un'estremità, e lavata ripetutamente in etanolo 70% per eliminare i sali residui e l'eccesso di alcool isopropilico. Dopo aver fatto evaporare l'etanolo per qualche secondo a temperatura ambiente, il DNA è stato risospeso in 500  $\mu\text{l}$  di TE 1X o acqua sterile.

✓ Reazione di amplificazione(PCR) delle regioni geniche di interesse

Per amplificare le regioni geniche di nostro interesse, è stata utilizzata la reazione a catena della polimerasi (PCR, Polimerase Chain Reaction). Per effettuare tale amplificazione abbiamo utilizzato 3 coppie di primers complementari alle estremità del frammento specifico di nostro interesse.

La reazione di PCR è stata condotta in un volume finale di 50µl, con i reagenti e secondo le condizioni riportate in tabella 4.

**Tab.4 Reagenti e condizioni di PCR**

Reagenti	C <sub>i</sub>	C <sub>f</sub>	V <sub>i</sub>
Buffer (5mM TrisHCl pH 8.3, 50mM KCl)	10X µM	1X µM	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5 mM	1.5 ml
dNTP	5 mM	0.125 mM	1.25 µl
Primer FW	100 µM	20 µM	0.2 µl
Primer RW	100 µM	20 µM	0.2 µl
Taq Polymerase	5 U/µl	1 U/µl	0.25 µl
DNA	100 ng		2 µl
H <sub>2</sub> O			40.6 µl

Le sequenze dei primers che identificano i polimorfismi in studio sono riportati in tabella 5.

**Tab.5 Sequenze dei primers**

GENE	rs	Forward sequence	Reverse sequence
CES1	8192935	CCAGGGTAGGAAGGACCCTA	CCAAATAAAAAGCTTGGGGAAA
CES1	2244613	CTCATGCCCTTAAAAGCCCC	AAGACAGCACCTCATCCCAT
ABCB1	4148738	GGGGTCAACCTTCTGCTTTT	ATTTAACCCCTCGGCTTCAT

Il processo d'amplificazione è reso automatico mediante l'uso di un termociclatore la cui temperatura e i tempi possono essere variati secondo le caratteristiche degli ampliconi specifici.

In una prima fase il DNA è incubato a 95 °C per 3 minuti, in modo da causare la denaturazione dei due filamenti, così da rendere disponibili i siti d'ibridazione per i primers.

Nella seconda fase si ha l'annealing o ibridazione dei primers alla sequenza target, portando la miscela di reazione ad una temperatura inferiore rispetto a quella di denaturazione, detta T<sub>m</sub> (Temperatura di melting), che dipende dalla composizione in basi dell'oligonucleotide.

La  $T_m$  si calcola con la seguente formula:  $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$  dove  
(A+T) = somma del numero di adenine e timine presenti nella sequenza del primer;  
(G+C) = somma del numero di guanina e citosina presenti nella sequenza del primer.  
Tale temperatura può influenzare la specificità della reazione, nel senso che temperature di annealing basse favoriscono la formazione di aspecifici, mentre temperature molto alte rendono selettiva la reazione di ibridazione primer-stampo.  
La terza fase è quella di elongazione, che avviene nel nostro caso a 72° per 1 minuto, in cui si ha la replicazione del frammento in presenza dei deossinucleotiditri-fosfato (dNTP) e della DNA polimerasi che determina l'allungamento dei primers in direzione 5'→3'. Il prodotto che si ottiene dopo il primo ciclo è di lunghezza indeterminata ed è definito long product. Nei cicli successivi i prodotti che si accumulano derivano dall'amplificazione di frammenti a loro volta amplificati nei cicli precedenti e non dalla sequenza stampo. Tali prodotti sono frammenti di DNA che terminano con le sequenze specifiche dei primers utilizzati e sono definiti short-product. Nella fase d'allungamento è utilizzata una Taq polimerasi, che funziona ad una temperatura ottimale intorno a 70-75°C ed è termostabile; questo gli permette di resistere alle alte temperature imposte dalla denaturazione con il vantaggio di non doverla aggiungere ad ogni ciclo. Inoltre, tale enzima conserva un'attività esonucleasica 5'→3' mentre manca di quella 3'→5'.  
Il prodotto amplificato è stato sottoposto ad analisi elettroforetica su gel di agarosio al 2%, e visualizzato mediante l'utilizzo di un intercalante a fluorescenza del DNA (etidio bromuro) e di un transilluminatore a raggi UV.

✓ Sequenziamento diretto per la caratterizzazione molecolare dei polimorfismi

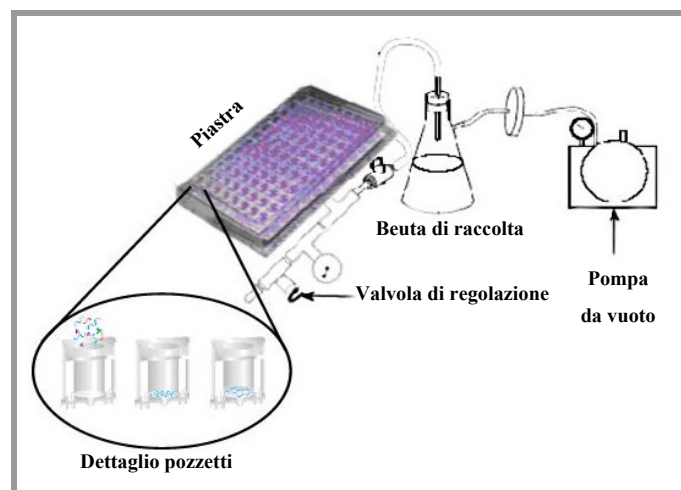
La procedura di sequenziamento è costituita da 4 step:

1. Prima purificazione: costituito dall'eliminazione dei reagenti utilizzati nella reazione di PCR e non consumati;
2. Marcatura: ibridazione del DNA con ddNTP fluorescenti;
3. Seconda purificazione: rimozione degli eccessi di basi non fluorescenti non consumati;
4. Corsa elettroforetica capillare.

## 1. Prima purificazione

I prodotti di PCR sono sottoposti ad un processo di purificazione mediante l'utilizzo di una piastra Millipore (Montage), composta da 96 pozzetti. La piastra presenta sul fondo dei pozzetti una membrana in gel di silice in grado di trattenere il DNA e di far passare gli altri contaminanti di dimensioni ridotte. L'apparato di purificazione è composto da una pompa da vuoto, da una valvola di controllo della pressione, dal supporto per le piastre, dai tubi di collegamento e da una beuta di raccolta delle impurità (Fig.11). Per la prima purificazione si procede con le seguenti fasi:

- 1) Portare il volume di PCR a 100  $\mu$ l con TE 1X (oppure con H<sub>2</sub>O milliQ);
- 2) Pipettare il campione all'interno del pozzetto della piastra;
- 3) Aspirare il volume applicando una depressione di 20 atm fino a completa disidratazione (~8') per permettere il passaggio attraverso le maglie del gel di primers, basi, sali, buffer e dimeri di primers mentre il prodotto di PCR pulito resta nel pozzetto;
- 4) Far adsorbire su carta la condensa creatasi sulla base della piastra;
- 5) Aggiungere 25  $\mu$ l di TE 1X (oppure H<sub>2</sub>O milliQ) all'interno del pozzetto;
- 6) Mettere la piastra ad agitare per 10' a 250 Revs/min sull'apposito Orbital shaker;
- 7) Recuperare il prodotto purificato e quantizzare mediante corsa elettroforetica utilizzando un marcatore a PM e concentrazione nota.



**Fig.11:** Schema del sistema di purificazione.

## 2. Marcatura e principio della reazione di Sanger

Consiste nell'ibridazione del DNA con dideossinucleotidi (ddNTP) marcati mediante fluorofori, ognuno diverso per ciascuna base. Questa tecnica prevede l'uso di uno



stampo di DNA a singola elica, un solo primer (Forward e Reverse), una DNA polimerasi, deossi (dNTP) e dideossinucleotidi trifosfati. La doppia elica di DNA è denaturata per consentire al primer di ibridarsi alla regione da sequenziare. La polimerasi utilizzando il primer come innesco della reazione incorpora i dNTP o i ddNTP complementari, secondo un principio di competizione. Ogni qualvolta l'enzima inserisce il ddNTP, essendo questo privo del gruppo 3'OH, provoca uno stop della reazione di polimerizzazione. Il rapporto di concentrazione di ddNTP e dNTP è tale che l'enzima al termine della reazione produce una serie di frammenti che differiscono, uno dall'altro, di un solo nucleotide in 3' e tutti contengono il primer all'estremità 5'. I ddNTP sono marcati mediante un fluoroforo, la rodamina, molecola che produce uno spettro d'emissione caratteristico per ogni ddNTP a cui è legato e che ha la caratteristica di produrre un segnale omogeneo con bassissimo rumore di fondo. La DNA polimerasi usata nella reazione di sequenziamento è la T7 DNA polimerasi, caratterizzata da:

- elevata processività, che riduce il distacco precoce della polimerasi dal filamento stampo;
- attività esonucleasica 3'→5' bassa o nulla, necessaria per ridurre la capacità di discriminazione tra il dNTP e i suoi analoghi ddNTP;
- attività esonucleasica 5'→3' bassa o nulla, che evita l'inserimento di nucleotidi all'estremità 5' che deve restare invariata.

I reagenti e le condizioni di marcatura sono riportati in tabella 6.

**Tab.6 Reagenti e condizioni di marcatura**

Reagenti	C <sub>f</sub>	V <sub>olume</sub>
Buffer 10X	1X	2 µl
Primer FW/RW	0.3µM	1.6 µl
MIX 3.1	1X	1 µl
DNA		1.5 µl
H <sub>2</sub> O		3.9 µl
Vol. fin.		10 µl

E' possibile marcare sia in forward che in reverse, la doppia marcatura del frammento permette di leggere la sequenza in tutta la sua lunghezza e di confermare direttamente la presenza di varianti nella sequenza.

### 3. Seconda purificazione

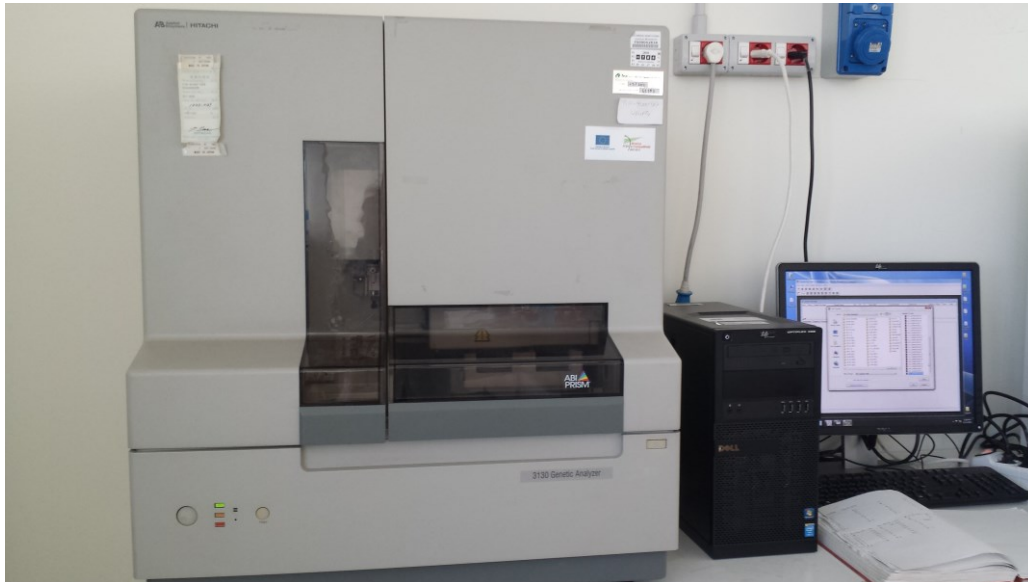
Al termine di questa reazione il prodotto ottenuto è sottoposto ad un'ulteriore purificazione per eliminare i dNTP e ddNTP fluorescenti che non sono stati consumati nel processo di marcatura. Per questa seconda purificazione si usano piastre Millipore, simili a quelle della prima, che contengono all'interno dei pozzetti un diverso tipo di resina, la cui composizione è tutelata da brevetto aziendale, specifica per trattenere il prodotto della marcatura. Il protocollo di seconda purificazione prevede di:

- 1) Aggiungere 20  $\mu$ l di injection solution alla reazione di marcatura e trasferire nei pozzetti della piastra;
- 2) Applicare una depressione di 25 atm fino a completa disidratazione del campione (circa 3' - 4');
- 3) Far adsorbire su carta la condensa creatasi sulla base della piastra;
- 4) Ripetere dal punto 1) al punto 3);
- 5) Aggiungere altri 20  $\mu$ l di injection solution e mettere la piastra ad agitare per 3'-4' a 180 Revs/min sull'apposito Orbital shaker;
- 6) Recuperare i campioni risospesi e trasferirli all'interno dei pozzetti delle piastre per sequenza.

### 4. Corsa elettroforetica capillare

La metodica del sequenziamento diretto dei campioni è stata eseguita mediante l'uso del sequenziatore automatico ABI 3130 Genetic Analyzer (Fig.12). Con questa metodica di sequenziamento si analizzano 4 campioni di DNA marcati con fluorescenza contemporaneamente. Il secondo purificato ottenuto è caricato all'interno delle piastre da 96 pozzetti per il sequenziatore, previa denaturazione a 95°C per 1 minuto. Il campione (4  $\mu$ l), nel rapporto di 1:4, è risospeso in 12  $\mu$ l di formammide che ha una funzione parzialmente denaturante, evita la formazione di legami o strutture secondarie tra i frammenti da separare mediante l'elettroforesi capillare, lasciando così i frammenti a singolo filamento. La piastra così preparata è

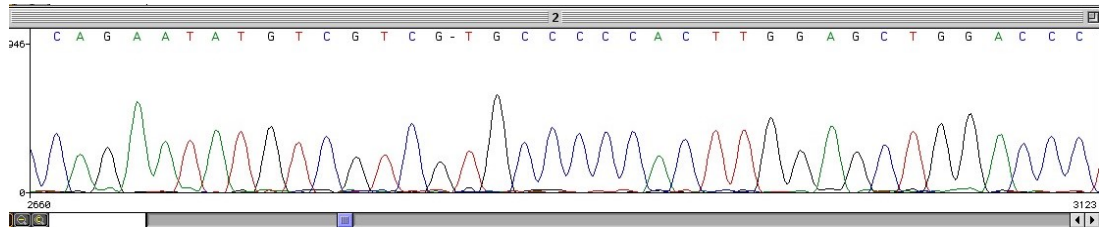
collocata nel sequenziatore automatico. I capillari sono riempiti con il gel di poliacrilammide che ha la funzione di separare i frammenti durante la corsa elettroforetica.



**Fig.12** ABI 3130 Genetic Analyzer

Applicando una piccola differenza di potenziale, una quantità di campione sufficiente per l'analisi è automaticamente aspirata all'interno dei capillari. I capillari si immergono quindi all'interno della vaschetta contenente il buffer di corsa 1X ottenuto dalla diluizione della soluzione madre 10X contenente acido etilendiamminotetracetico (EDTA). Questo permette la chiusura del circuito e la creazione di una differenza di potenziale pari a 15kV necessaria per la separazione elettroforetica dei campioni. Il capillare usato ha una lunghezza di 36 cm e permette la lettura in modo attendibile di circa 800 bp. Il capillare di silice è rivestito lungo tutta la sua lunghezza da una guaina. A livello della finestra di lettura è presente un'interruzione della guaina che consente il passaggio di una luce laser a ioni di Argon. Il prodotto di marcatura, a livello della finestra di lettura, è colpito dalla luce laser che eccita il fluoroforo. La fluorescenza emessa è trasformata in un segnale elettronico da una CCD camera, analizzato ed interpretato da un apposito software e trasformato in un diagramma a picchi o elettroferogramma (Fig.13). L'identificazione di una mutazione è ritenuta affidabile quando l'elettroferogramma è composto da picchi alti e risolti con un rumore di fondo basso. Le sequenze

ottenute sono analizzate mediante il software Navigator che permette l'allineamento multiplo delle sequenze aumentando sensibilmente la velocità di analisi e consentendo un confronto diretto tra le sequenze dei diversi campioni in esame.



**Fig.13** Esempio di elettroferogramma

#### *6.4. Analisi statistica*

Le differenze nelle caratteristiche basali tra i genotipi sono stati valutati utilizzando analisi univariata della varianza (ANOVA). Nei modelli di regressione lineare, le concentrazioni del dosaggio del farmaco sono stati aggiustate per potenziali fattori confondenti, come l'età di inizio della TAO, il sesso, la co-medicazione (ad esempio l'uso di inibitori della pompa protonica, l'uso di inibitori della P-glicoproteina moderati o forti), e nel caso del dabigatran anche con la funzionalità renale, per valutare un effetto indipendente degli alleli indagati. Il ruolo dei diversi alleli è stato studiato assumendo effetto diverso (dominante, recessivo). Modelli generali fattoriali ANOVA, corretti per le stesse variabili sono stati usati per esaminare la possibilità di una interazione tra i diversi genotipi indagati e la dose giornaliera di anticoagulante prescritto. Tutte le analisi sono state effettuate utilizzando il pacchetto statistico per le scienze sociali (SPSS 22.0 per Macintosh). Un livello due code di significatività del 5% è stato utilizzato per tutte le prove.

## 7.0 RISULTATI

### 7.1. Parametri clinici e fisiologici dei pazienti e farmaci anticoagulanti utilizzati

In una prima fase, sono stati analizzati 92 pazienti, di cui 51 uomini e 41 donne, in trattamento con Dabigatran e con un'età media di 72 anni. Per la successiva analisi statistica, abbiamo suddiviso i pazienti in base alla dose del farmaco (110mg o 150mg), alle caratteristiche cliniche e fisiologiche riportate in tabella 7.

**Tab.7 Caratteristiche cliniche e fisiologiche dei pazienti in cura con Dabigatran**

Variabili	Pazienti	Dabigatran etexilate	
	n=92	110 mg (n=61)	150 mg (n=31)
<b>Età</b>	72.0 (52-92)	74.5 (52-92)	69 (57-75)*
<b>Uomini n (%)</b>	51 (55.4)	28 (45.9)	23 (74.2)**
<b>BMI</b>	26.1 (21.0-37.7)	25.9 (21.0-36.3)	26.5 (23.4-37.7)
<b>Clearance Creatinina</b>	70.3 (29.5-128.5)	65.9 (29.5-128.5)	78.6 (43.9-112.7)***
<b>Amiodarone</b>	4 (0-13)	4 (0-13)	4 (0-9)

\* Mann-Whitney U-test:  $p < 0.001$

\*\* corretto per il test del  $\chi$ -quadrato:  $p = 0.018$

\*\*\* Mann-Whitney U-test:  $p = 0.003$

Poiché il dabigatran è eliminato principalmente immodificato attraverso le urine e l'escrezione renale rappresenta l'80% della sua clearance totale, oltre a fattori quali età, sesso e co-medicazione, nell'analisi statistica abbiamo considerato anche BMI e funzionalità renale, espressa come clearance della creatinina, in quanto una ridotta funzionalità renale aumenta l'esposizione al dabigatran e prolunga la sua emivita.

Abbiamo osservato un'elevata significatività dell'età (Mann-Whitney U-test:  $p < 0.001$ ), del sesso maschile (test  $\chi$ -quadrato:  $p = 0.018$ ) e della clearance della creatinina (Mann-Whitney U-test:  $p = 0.003$ ) con la dose di 150 mg di dabigatran.

Il sesso maschile, l'età media e la clearance della creatinina, inoltre, sono significativamente differenti tra i pazienti che assumono la dose di 110 mg per due volte al giorno e coloro che ne assumono 150 mg per due volte al giorno.

Per il Rivaroxaban sono stati analizzati 51 pazienti, di cui 30 uomini e 21 donne, con un'età media di 71.5 anni. I pazienti sono stati suddivisi in base alle dosi del farmaco

(15mg e 20mg), le cui caratteristiche cliniche e fisiologiche sono riportate in tabella 8.

**Tab.8 Caratteristiche cliniche e fisiologiche dei pazienti in cura con Rivaroxaban**

Variabili	Pazienti	Rivaroxaban	
	n=51	15 mg (n=5)	20 mg (n=46)
<b>Età</b>	71.5 (21-91)	84.5 (73-90)	69.5 (24-91)*
<b>Uomini n</b>	30 (57.7%)	3 (60.0%)	27 (58.7%)
<b>Amiodarone</b>	5 (9.8%)	0	5 (10.9%)

\* Mann-Whitney U-test:  $p < 0.001$

Dal punto di vista clinico, poichè il rivaroxaban per 1/3 è escreto immodificato per via renale, non abbiamo considerato variabili come la funzionalità renale e del BMI, ma le uniche variabili considerate sono state l'età, il sesso e la co-medicazione.

Dall'analisi statistica tra i suddetti parametri clinici e fisiologici dei pazienti e la dose di farmaco somministrata, abbiamo riscontrato una certa significatività dell'età del paziente con la dose di 20 mg di rivaroxaban (Mann-Whitney U-test:  $p < 0.001$ ), mentre non abbiamo osservato alcuna significatività con il sesso e con un farmaco comunemente utilizzato in pazienti con FA, quale l'amiodarone.

Per l'Apixaban sono stati arruolati 79 pazienti, di cui 48 uomini e 28 donne, con un'età media di 76 anni. Abbiamo suddiviso i pazienti in base alle dosi di farmaco (5mg e 10mg), le cui caratteristiche cliniche e fisiologiche sono riportate in tabella 9.

**Tab.9 Caratteristiche cliniche e fisiologiche dei pazienti in cura con Apixaban**

Variabili	Pazienti	Apixaban	
	n=79	5 mg (n=18)	10 mg (n=61)
<b>Età</b>	76 (38-90)	84 (70-90)	74.1 (38-86)*
<b>Uomini n</b>	48 (60.8%)	7 (38.8%)	41 (67.2%)**
<b>Amiodarone</b>	18 (22.2%)	2 (11.9%)	16 (26.2%)

\* Mann-Whitney U-test:  $p < 0.001$

\*\* corretto per il test del  $\chi$ -quadrato:  $p = 0.03$

Anche per l'apixaban dal punto di vista clinico non abbiamo preso in considerazione la funzionalità renale e il BMI, in quanto l'apixaban è escreto per via renale nel 25% e le uniche variabili considerate sono state l'età, il sesso e la co-medicazione.

Dall'analisi statistica abbiamo osservato una certa significatività dell'età del paziente (Mann-Whitney U-test:  $p < 0.001$ ) e del sesso maschile (test  $\chi$ -quadrato:  $p = 0.03$ ) con la dose di 10 mg di apixaban e nessuna significatività con la co-medicazione.

#### *Analisi genotipica*

Dei 92 pazienti che assumono il Dabigatran, 22 portano il genotipo AA per lo SNP (ABCB1) rs4148738, mentre 43 e 27 individui portato rispettivamente, genotipo AG e GG (Tab.10).

Per quanto riguarda il gene CES1, 43 pazienti hanno mostrato genotipo CC per lo SNP rs8192935, 40 CT e 9 TT (Tab.10).

Invece, per lo SNP del gene CES1 rs2244613, 53 pazienti mostrano il genotipo AA, mentre 37 e 2 individui portano rispettivamente genotipo AC e CC (Tab.10).

**Tab.10 Distribuzione dei genotipi di ABCB1 e CES1 e frequenze alleliche**

GENE	SNP	Genotipo	n (%)	Allele minore	MAF (%)	HWE p value	MAF CEU* (%)
<b>ABCB1</b>	rs4148738	AA	22 (23.9)	G	47.3	0.678	48.2
		AG	43 (46.7)				
		GG	27 (29.4)				
<b>CES1</b>	rs8192935	CC	43 (46.7)	T	31.5	0.956	30.8
		CT	40 (43.5)				
		TT	9 (9.8)				
<b>CES1</b>	rs2244613	AA	53 (57.6)	C	22.3	0.230	15.0
		AC	37 (40.2)				
		CC	2 (2.2)				

SNP single nucleotide polymorphism, MAF minor allele frequency, HWE Hardy–Weinberg equilibrium; \*Utah residents with ancestry from northern and western Europe (CEU) (<http://snp.cshl.org/citinghapmap.html.en>)

Per tutti i polimorfismi indagati, le frequenze genotipiche erano normalmente distribuiti e non significativamente diverse da quelle attese utilizzando il modello di Hardy-Weinberg. Come previsto, i 2 SNPs del CES1, rs8192935 e rs2244613, erano in linkage disequilibrium ( $r^2 = 0,62$  e  $D' = 1.00$ ).

Nessuna differenza significativa è stata osservata tra il gruppo di pazienti in terapia con 150 mg e quelli in terapia con 110 mg.

Mentre per i pazienti che assumono Rivaroxaban e Apixaban è stato solo studiato il polimorfismo del gene ABCB1 e si è osservata la distribuzione allelica (Tab.11)

**Tab.11 Frequenza allelica dello SNP rs4148738 del gene ABCB1**

	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>
<b>Rivaroxaban</b>	18 (22.5%)	39 (48.8%)	23 (28.7%)
<b>Apixaban</b>	19 (36.7%)	26 (51.7%)	6 (11.6%)

Non è stata osservata alcuna significatività con il modello HWE con frequenze genotipiche non diverse da quelle attese.

#### *Analisi fenotipica*

Per i pazienti che assumono dose 150 mg di Dabigatran, le concentrazioni di picco (153,8 ng/dl; SD:103,0) e di valle (90,6 ng/dl; SD:78,0) non sono risultate significativamente più alte rispetto al gruppo che assume dose 110 mg (135,5 ng/dl; SD:85,5 e 76,9 ng/dl; SD:49,5). Si è osservato, però, che le concentrazioni di dabigatran di valle sono significativamente più elevate nelle donne (89,5 ng/dl; SD:50,4) rispetto agli uomini (74,3 ng/dl; SD:67,4; Mann-Whitney U -test:  $p=0,011$ ). Inoltre, le concentrazioni di dabigatran di valle sono inversamente correlate con i valori di clearance della creatinina (correlazione di Spearman:  $p=0,047$ ) e nessuna associazione è stata trovata tra le concentrazioni di picco e le variabili cliniche o analitiche (BMI e amiodarone).

Per i pazienti che assumono dose 20 mg di Rivaroxaban, le concentrazioni di picco (217,4 ng/dl; SD:95,2) e di valle (33,4 ng/dl; SD:28,9) non sono risultate significativamente più alte rispetto al gruppo di pazienti che assume dose 15 mg (257 ng/dl; SD:153,1 e 29,2 ng/dl; SD:7,2). Inoltre, non è stata osservata alcuna differenza tra i sessi.

Invece, per il gruppo di pazienti che assume dose 10 mg di Apixaban, le concentrazioni di picco (238,35 ng/dl; SD:86,4) sono risultate significativamente più elevate rispetto alle concentrazioni di picco del gruppo che assume dose 5 mg



(183,41 ng/dl; SD:102,1; Mann-Whitney U-test:  $p=0.004$ ), mentre non c'è significatività nelle concentrazioni di valle tra chi assume 10 mg (128,34 ng/dl; SD:67,5) e chi assume 5 mg di apixaban (108,55 ng/dl; SD:76,8), così come non c'è alcuna differenza tra i sessi.

#### *Effetti di ABCB1 e CES1 sui livelli plasmatici*

Per quanto riguarda lo SNP di ABCB1 rs4148738, i pazienti in cura con Dabigatran portatori di uno o entrambi gli alleli A hanno mostrato concentrazioni di valle inferiori al 5% rispetto agli omozigoti per l'allele G; mentre le concentrazioni di picco sono risultate simili tra i diversi genotipi.

Gli eterozigoti per l'allele minore rs8192935 CES1 hanno mostrato una diminuzione del 3% delle concentrazioni di valle, mentre gli omozigoti dell'11%.

L'allele minore di rs2244613 CES1 è stato associato ad una diminuzione del 2% delle concentrazioni di valle negli eterozigoti e del 3% negli omozigoti. Invece, le concentrazioni di picco sono risultate simili tra i diversi genotipi in entrambi gli SNP di CES1.

La possibilità che i diversi genotipi modulino concentrazioni di picco o di valle del dabigatran è stata analizzata in un modello di regressione lineare, aggiustato per età, sesso, co-medicazione, clearance della creatinina e dose di dabigatran. A causa del linkage disequilibrium osservato tra i 2 SNPs di CES1 e delle differenze tra genotipi, un modello di statistica multivariata è stato eseguito per lo SNP di CES1 rs8192935. Per quanto riguarda rs4148738 ABCB1, i pazienti portatori di 1 o 2 alleli A sono stati confrontati con gli omozigoti per l'allele G.

Un modello di regressione lineare ha rivelato una significativa associazione di rs2244613 CES1 ( $p=0,040$ ), con concentrazioni di valle di dabigatran. Nessun effetto significativo è stato rilevato per rs4148738 ABCB1. Come previsto, un effetto significativo è stato esercitato dalla clearance della creatinina ( $p=0.014$ ). L'interindividualità di risposta, data dal modello di regressione lineare (R-quadrati), rappresenta il 5,1% per rs2244613 CES1 e il 5,7% per la clearance della creatinina. Per osservare la presenza di interazioni tra variabili significative, è stato seguito un modello fattoriale ANOVA, ed è stata confermata l'associazione con la clearance della creatinina ( $p=0,004$ ), è stata trovata anche un'associazione con il sesso

( $p=0,043$ ) e un valore borderline con rs8192935 CES1 ( $p=0,053$ ). La concentrazione di valle del dabigatran è significativamente più alta nei pazienti portatori del CES1 SNP rs8192935 CC genotipo (85,4 ng / dl) rispetto agli eterozigoti (62,0 ng / dl) e ai pazienti con genotipo TT (53,5. Ng / dl), con una significatività rispettivamente di  $p=0,055$  e 0,033. Un modello alternativo, ipotizza un effetto dominante dell'allele minore visti i risultati alquanto simili. In realtà, l'analisi ha confermato l'associazione con rs8192935 CES1 ( $p=0,023$ ), la clearance della creatinina ( $p=0,011$ ) e il sesso ( $p=0,043$ ). La concentrazione di valle del dabigatran è significativamente più bassa nei pazienti portatori dell'allele T rs8192935 CES1 (62,1 ng/dl) rispetto ai pazienti con genotipo CC (86,3 ng/dl).

Nel caso del Rivaroxaban per entrambe le dosi, non è stato trovato nessun effetto del polimorfismo ABCB1 sui livelli plasmatici analizzati.

Per l'Apixaban, invece, è stata osservata un'associazione con la dose di 10 mg. L'interindividualità di risposta, data dal modello di regressione lineare (R-quadrati), rappresenta il 4,6% per rs4148738 ABCB1 e il 7,1% per il sesso. Inoltre, il modello fattoriale ANOVA, ha confermato l'associazione con il sesso ( $p=0,021$ ) e con lo SPN di ABCB1 ( $p=0,048$ ).

## 8.0 CONCLUSIONI

Poiché il dabigatran etexilato è un substrato della glicoproteina P e la co-somministrazione di farmaci modulano l'attività della stessa, si può avere ripercussione significativa sulle concentrazioni di dabigatran nel plasma.

La P-glicoproteina è codificata dal gene ABCB1, diversi SNP sono stati identificati nel locus del gene ABCB1 e sono stati associati alle concentrazioni plasmatiche dei substrati della P-glicoproteina. Quindi, è probabile che il genotipo ABCB1 vada a modulare l'assorbimento e la disponibilità del dabigatran etexilato. Infatti, abbiamo trovato nel nostro lavoro una significativa associazione di frequenze alleliche e genotipiche dello SNP rs4148738 ABCB1 con le concentrazioni di dabigatran.

Una volta che dabigatran etexilato entra nel flusso sanguigno, è biotrasformato dalla carbossilesterasi 1 (CES1) in metabolita attivo, diventa così l'inibitore diretto della trombina. Nel nostro studio, lo SNP del CES1 rs8192935 non ha evidenziato associazione con le concentrazioni di picco del dabigatran.

D'altra parte, portatori di allele T hanno mostrato concentrazioni di valle significativamente inferiori rispetto ai portatori del genotipo CC. I gruppi di pazienti con differenti genotipi, quando hanno iniziato la terapia anticoagulante, non hanno mostrato differenza significativa per sesso, età, BMI e clearance della creatinina. Entrambi i modelli statistici applicati, la regressione lineare multipla e fattoriale ANOVA, hanno confermato che lo SNP del CES1 rs8192935 influenza in modo significativo le concentrazioni minime di dabigatran. Questi risultati sono in accordo con i risultati precedenti e indicano chiaramente un ruolo importante di variazioni del gene CES1 nella modulazione delle concentrazioni ematiche di dabigatran. Concentrazioni di valle di dabigatran sono state linearmente correlati a eventi trombotici come episodi di sanguinamento. Caratteristiche demografiche, come l'età e la clearance della creatinina, sono le variabili più significativamente associate con il rischio di eventi avversi. Tale variazione genica nel gene CES1 sembra svolgere un ruolo importante e potrebbe far luce sulla variabilità inter-individuale delle concentrazioni ematiche di dabigatran.

Osservando i valori plasmatici di Rivaroxaban e la condizione allelica non è stata verificata alcuna associazione in relazione al sesso e all'età.

Per quanto riguarda i risultati dell'analisi statistica tra dose di Apixaban e costituzione allelica osservata, è stata evidenziata un'associazione dello SNP ABCB1 che potrebbe spiegare "inter-individualità di risposta al farmaco da parte del singolo paziente, visto che la concentrazione di picco del dabigatran in dose 10 mg è significativamente più alta rispetto a chi assume la dose di 5 mg. Oltre ad evidenziare un'associazione significativa con il sesso.

Dai risultati ottenuti dal nostro studio deduciamo che un'indagine genotipica, previa somministrazione del dabigatran, potrebbe essere utile al terapeuta per la scelta della posologia ottimale da somministrare. Lo stesso risultato non si evince dai dati ottenuti dalle analisi effettuate per l'apixaban e il rivaroxaban per i quali, probabilmente, anche per la scarsa numerosità dei pazienti esaminati non è stata verificata nessuna significativa associazione tra i genotipi, la posologia e il tipo di farmaco utilizzato, a parte una lieve significatività tra sesso e apixaban con dosaggio 10mg. A conferma di questi dati, quindi, andrebbero studiati un maggior numero di pazienti per escludere definitivamente la responsabilità dei geni da noi analizzati sulla variabilità di risposta farmacologica al rivaroxaban e apixaban.

## 9.0 BIBLIOGRAFIA

1. Geerts WH, Bergqvist D, Pineo GF, et al. Prevention of venous thromboembolism: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines, 8th ed. *Chest* 2008; 133 (6 suppl): 381S-453.
2. Goodman & Gilman: "Le basi farmacologiche della terapia. McGraw-Hill 1 ediz. Italiana, 1997.
3. Virjo I, Mäkelä K, Aho J et al. Who receives anticoagulant treatment with warfarin and why? A population-based study in Finland. *Scand J Prim Health Care*. 2010 Dec;28(4):237-41.
4. Pirmohamed M. Warfarin: almost 60 years old and still causing problems. *Br J Clin Pharmacol*. 2006 Nov;62(5):509-11.
5. Jones M, McEwan P. et al., Evaluation of the pattern of treatment, level of anticoagulation control, and outcome of treatment with warfarin in patients with non-valvular atrial fibrillation: a record linkage study in a large British population. *Heart* 2005;91:472-7.
6. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest* 2003 Sep;124 (3 Suppl):26S-32S.
7. Loscalzo J, Schafer AI. 2002. Overview of hemostasis and fibrinolysis. In *New Therapeutic Agents in Thrombosis and Thrombolysis*, ed. A Sasahara, J Loscalzo, pp.1-9. New York: Marcel Dekker. 2nd ed.
8. Cate H. Pathophysiology of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *Crit Care Med* 2000; Sep;28(9Suppl.):S9-S11.
9. Ansell J, Hirsh J, Hylek E, Jacobson A, Crowther M, Palareti G. Pharmacology and management of the vitamin K antagonists: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008 Jun;133(6 Suppl):160S-198S.
10. Ufer M. Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists: warfarin, phenprocoumon and acenocoumarol. *Clin Pharmacokinet*. 2005;44(12):1227-46.
11. Pinede L, Duhaut P, Ninet J. Management of oral anticoagulants in the treatment of venous thromboembolism. *Eur J Intern Med*. 2001 Apr;12(2):75-85.
12. Kirchhof P et al., Comprehensive risk reduction in patients with atrial fibrillation: Emerging diagnostic and therapeutic options. Executive summary of the report from the 3rd AFNET/EHRA consensus conference. *Europace* 2012;14:8-27.
13. Healey JS, Connolly SJ, Gold MR, Israel CW, Van Gelder IC, Capucci A, Lau CP, Fain E, Yang S, Bailleul C, Morillo CA, Carlson M, Themeles E, Kaufman ES, Hohnloser SH; ASSERT Investigators. Subclinical atrial fibrillation and the risk of stroke. *N Engl J Med* 2012;366:120-129.
14. Binici Z, Intzilakis T, Nielsen OW, Kober L, Sajadieh A. Excessive supraventricular ectopic activity and increased risk of atrial fibrillation and stroke. *Circulation* 2010;121:1904-1911.
15. Stewart S, Murphy NF, Walker A, McGuire A, McMurray JJ. Cost of an emerging epidemic: an economic analysis of atrial fibrillation in the UK. *Heart*. 2004 Mar;90(3):286-92.
16. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke*. 1991 Aug;22(8):983-8.
17. Bilato C, Corti MC, Baggio G, Rampazzo D, Cutolo A, Iliceto S, Crepaldi G. Prevalence, functional impact, and mortality of atrial fibrillation in an older Italian population from the Pro.V.A. study. *Am J Cardiol*. 2009 Oct 15;104(8):1092-7
18. Lloyd-Jones DM, Wang TJ, Leip EP, Larson MG, Levy D, Vasan RS, D'Agostino RB, Massaro JM, Beiser A, Wolf PA, Benjamin EJ. Lifetime risk for development of

- atrial fibrillation: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2004 Aug 31;110(9):1042-6.
19. Camm AJ, Lip GY, De Caterina R et al. 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation--developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association.; ESC Committee for Practice Guidelines-CPG; Document Reviewers. *Europace*. 2012 Oct;14(10):1385-413.
  20. Di Minno MN, Russolillo A, Di Minno A et al. Direct anticoagulant drugs to overcome limitations of vitamin K antagonists. A critical appraisal of data in atrial fibrillation patients. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2013 Mar;18(1):9-23.
  21. Salem DN, O'Gara PT, Madias C, Pauker SG; American College of Chest Physicians. Valvular and structural heart disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008 Jun;133(6 Suppl):593S-629S.
  22. Bonow RO, Carabello BA, Chatterjee K, de Leon AC Jr, Faxon DP, Freed MD, Gaasch WH, Lytle BW, Nishimura RA, O'Gara PT, O'Rourke RA, Otto CM, Shah PM, Shanewise JS; 2008 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1998 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease): endorsed by the Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. 2006 Writing Committee Members; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force. *Circulation*. 2008 Oct 7;118(15):e523-661).
  23. Kearon C, Akl EA, Comerota AJ, Prandoni P, Bounameaux H, Goldhaber SZ, Nelson ME, Wells PS, Gould MK, Dentali F, Crowther M, Kahn SR. Antithrombotic therapy for VTE disease: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012 Feb;141(2 Suppl):e419S-94S).
  24. Schulman S, Beyth RJ, Kearon C, Levine MN. Hemorrhagic complications of anticoagulant and thrombolytic treatment: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008 Jun;133(6 Suppl):257S-298S.)
  25. Gage BF, Yan Y, Milligan PE, Waterman AD, Culverhouse R, Rich MW, Radford MJ. Clinical classification schemes for predicting hemorrhage: results from the National Registry of Atrial Fibrillation (NRAF). *Am Heart J*. 2006 Mar;151(3):713-9.)
  26. Rossi F. et al, *Farmacologia: principi di base e applicazioni terapeutiche*, 2° edizione, 2011.
  27. Muller M., Kersten S. Nutrigenomics: goals and strategies. *Nat Rev Genet*. 2003 Apr;4(4):315-22.
  28. Judson R, Stephens JC. Notes from the SNP vs. haplotype front. *Pharmacogenomics*. 2001 Feb;2(1):7-10.
  29. Goodman & Gilman: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th edition, 2006.
  30. Weber WW. *Pharmacogenetics*. Oxford: Oxford University Press; 1997.
  31. Ezekowitz MD, Reilly PA, Nehmiz G, et al. Dabigatran with or without concomitant aspirin compared with warfarin alone in patients with nonvalvular atrial fibrillation (PETRO study). *Am J Cardiol* 2007;100: 1419–26.

32. Connoy SJ, Eikelboom J, O'Donnell M, et al. Challenges of establishing new antithrombotic therapies in atrial fibrillation. *Circulation* 2007;116:449–55.
33. Huel NH, Nar H, Priepke H, et al. Structure-based design of novel potent nonpeptide thrombin inhibitors. *J Med Chem* 2002; 45: 1757–1766.
34. Cabral KP. Pharmacology of the new target-specific oral anticoagulants. *J Thromb Thrombolysis*. 2013 Aug;36(2):133-40.)
35. Stangier J, Eriksson BI, Dahl OE, Ahnfelt L, Nehmiz G, Stähle H, Rathgen K, Svärd R. Pharmacokinetic profile of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate in healthy volunteers and patients undergoing total hip replacement. *J Clin Pharmacol*. 2005 May;45(5):555-63.
36. Eriksson BI, Dahl OE, Ahnfelt L, Kälebo P, Stangier J, Nehmiz G, Hermansson K, Kohlbrenner V. Dose escalating safety study of a new oral direct thrombin inhibitor, dabigatran etexilate, in patients undergoing total hip replacement: BISTRO I. *J Thromb Haemost*. 2004 Sep;2(9):1573-80.
37. Walenga JM, Adiguzel C. Drug and dietary interactions of the new and emerging oral anticoagulants. *Int J Clin Pract*. 2010 Jun;64(7):956-67.)
38. De Caterina R, Husted S, Wallentin L, Andreotti F, Arnesen H, Bachmann F, Baigent C, Huber K, Jespersen J, Kristensen SD, Lip GY, Morais J, Rasmussen LH, Siegbahn A, Verheugt FW, Weitz JI. New oral anticoagulants in atrial fibrillation and acute coronary syndromes: ESC Working Group on Thrombosis-Task Force on Anticoagulants in Heart Disease position paper.; Coordinating Committee. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Apr 17;59(16):1413-25.
39. Talati R. Dabigatran: A new orally available anticoagulant for prevention of strokes and thrombosis in patients with atrial fibrillation. *Formulary Journal of Modern Medicine* 2011; 46:44-53.
40. Sorbera LA, Bozzo J, Castaner J. Dabigatran/dabigatran etexilate. *Drugs Fut* 2005;30:877-85.
41. Southworth MR, Reichman ME, Unger EF. Dabigatran and postmarketing reports of bleeding. *N Engl J Med*. 2013 Apr 4;368(14):1272-4.
42. Depasse F, Busson J, Mnich J, et al. Effect of BAY 59-7939—a novel, oral, direct factor Xa inhibitor—on clot-bound factor Xa activity in vitro. *J Thromb Haemost* 2005;3(suppl 1):abstract P1104.
43. Perzborn E, Strassburger J, Wilmen A, et al. In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939: an oral, direct factor Xa inhibitor. *J Thromb Haemost* 2005; 3:514–21.
44. Turpie AG. Oral, direct factor Xa inhibitors in development for the prevention and treatment of thromboembolic diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1238–47.;
45. Kubitzka D, Becka M, Wensing G, Voith B, Zuehlsdorf M. Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of BAY 59-7939—an oral, direct Factor Xa inhibitor—after multiple dosing in healthy male subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 2005 Dec;61(12):873-80.
46. Kakar P, Watson T, Lip GY. Rivaroxaban. *Drugs today (Barc)* 2007;43:129–36.
47. Rezaie AR. Prothrombin protects factor Xa in the prothrombinase complex from inhibition by the heparinantithrombin complex. *Blood* 2001;97:2308–13.
48. Brufatto N, Ward A, Nesheim ME. Factor Xa is highly protected from antithrombin-fondaparinux and antithrombin-tenecteplase when incorporated into the prothrombinase complex. *J Thromb Haemost* 2003:1258–63.
49. Weinz C, Buetehorn U, Daehler H, et al. Pharmacokinetics of BAY 59-7939—an oral, direct factor Xa inhibitor—in rats and dogs. *Xenobiotica* 2005;35:891–910.

50. Kreutz R. Pharmacodynamic and pharmacokinetic basics of rivaroxaban. *Fundam Clin Pharmacol.* 2012 Feb;26(1):27-32.
51. Kubitzka D, Becka M, Mueck W, Halabi A, Maatouk H, Klause N, Lufft V, Wand DD, Philipp T, Bruck H. Effects of renal impairment on the pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of rivaroxaban, an oral, direct Factor Xa inhibitor. *Br J Clin Pharmacol.* 2010 Nov;70(5):703-12.
52. Mueck W, Kubitzka D, Becka M. Co-administration of rivaroxaban with drugs that share its elimination pathways: pharmacokinetic effects in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2013 Sep;76(3):455-66.
53. Weinz C, Schwarz T, Kubitzka D, Mueck W, Lang D. Metabolism and excretion of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in rats, dogs, and humans. *Drug Metab Dispos.* 2009 May;37(5):1056-64.
54. Mueck W, Lensing AW, Agnelli G, Decousus H, Prandoni P, Misselwitz F. Rivaroxaban: population pharmacokinetic analyses in patients treated for acute deep-vein thrombosis and exposure simulations in patients with atrial fibrillation treated for stroke prevention. *Clin Pharmacokinet.* 2011 Oct;50(10):675-86.
55. Said K. Hokusai-VTE: Edoxaban for the treatment of venous thromboembolism. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2013 Dec 30;2013(4):416-20.
56. Perzborn E, Strassburger J, Wilmen A, Pohlmann J, Roehrig S, Schlemmer KH, Straub A. In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939--an oral, direct Factor Xa inhibitor. *J Thromb Haemost.* 2005 Mar;3(3):514-21.
57. Roehrig S, Straub A, Pohlmann J, Lampe T, Pernerstorfer J, Schlemmer KH, Reinemer P, Perzborn E. Discovery of the novel antithrombotic agent 5-chloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methylthiophene-2-carboxamide (BAY 59-7939): an oral, direct factor Xa inhibitor. *J Med Chem.* 2005 Sep 22;48(19):5900-8.
58. Samama MM, Martinoli JL, LeFlem L, Guinet C, Plu-Bureau G, Depasse F, Perzborn E. Assessment of laboratory assays to measure rivaroxaban--an oral, direct factor Xa inhibitor. *Thromb Haemost.* 2010 Apr;103(4):815-25.
59. Samama MM, Amiral J, Guinet C, Le Flem L, Seghatchian J. Monitoring plasma levels of factor Xa inhibitors: how, why and when? *Expert Rev Hematol.* 2013 Apr;6(2):155-64.
60. Wong PC, Crain EJ, Xin B, Wexler RR, Lam PY, Pinto DJ, Luettgen JM, Knabb RM. Apixaban, an oral, direct and highly selective factor Xa inhibitor: in vitro, antithrombotic and antihemostatic studies. *J Thromb Haemost.* 2008 May;6(5):820-9.
61. Wong PC, Crain EJ, Watson CA, Wexler RR, Lam PY, Quan ML, Knabb RM. Razaxaban, a direct factor Xa inhibitor, in combination with aspirin and/or clopidogrel improves low-dose antithrombotic activity without enhancing bleeding liability in rabbits. *J Thromb Thrombolysis.* 2007 Aug;24(1):43-51.
62. Raghavan N, Frost CE, Yu Z, He K, Zhang H, Humphreys WG, Pinto D, Chen S, Bonacorsi S, Wong PC, Zhang D. Apixaban metabolism and pharmacokinetics after oral administration to humans. *Drug Metab Dispos.* 2009 Jan;37(1):74-81
63. Bristol-Myers Squibb Pharmaceuticals (2012) Eliquis (apixaban) product information. Bristol-Myers Squibb Pharmaceuticals, Princeton.
64. Frost C, Wang J, Nepal S, Schuster A, Barrett YC, Mosqueda-Garcia R, Reeves RA, LaCreta F. Apixaban, an oral, direct factor Xa inhibitor: single dose safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics and food effect in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2013 Feb;75(2):476-87.



65. Carreiro J, Ansell J. Apixaban, an oral direct Factor Xa inhibitor: awaiting the verdict. *Expert Opin Investig Drugs*. 2008 Dec;17(12):1937-45.
66. Connolly SJ, Eikelboom J, Joyner C, Diener HC, Hart R, Golitsyn S, Flaker G, Avezum A, Hohnloser SH, Diaz R, Talajic M, Zhu J, Pais P, Budaj A, Parkhomenko A, Jansky P, Commerford P, Tan RS, Sim KH, Lewis BS, Van Mieghem W, Lip GY, Kim JH, Lanus-Zanetti F, Gonzalez-Hermosillo A, Dans AL, Munawar M, O'Donnell M, Lawrence J, Lewis G, Afzal R, Yusuf S. Apixaban in patients with atrial fibrillation. *AVERROES Steering Committee and Investigators*. *N Engl J Med*. 2011 Mar 3;364(9):806-17.
67. He K, Luettgen JM, Zhang D, He B, Grace JE Jr, Xin B, Pinto DJ, Wong PC, Knabb RM, Lam PY, Wexler RR, Grossman SJ. Preclinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of apixaban, a potent and selective factor Xa inhibitor. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2011 Sep;36(3):129-39.
68. Raskob GE, Gallus AS, Pineo GF, Chen D, Ramirez LM, Wright RT, Lassen MR. Apixaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip or knee replacement: pooled analysis of major venous thromboembolism and bleeding in 8464 patients from the ADVANCE-2 and ADVANCE-3 trials. *J Bone Joint Surg Br*. 2012 Feb;94(2):257-64.
69. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, Lopes RD, Hylek EM, Hanna M, Al-Khalidi HR, Ansell J, Atar D, Avezum A, Bahit MC, Diaz R, Easton JD, Ezekowitz JA, Flaker G, Garcia D, Geraldles M, Gersh BJ, Golitsyn S, Goto S, Hermosillo AG, Hohnloser SH, Horowitz J, Mohan P, Jansky P, Lewis BS, Lopez-Sendon JL, Pais P, Parkhomenko A, Verheugt FW, Zhu J, Wallentin L. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *ARISTOTLE Committees and Investigators*. *N Engl J Med*. 2011 Sep 15;365(11):981-92.
70. Eriksson BI, Quinlan DJ, Weitz JI. Comparative pharmacodynamics and pharmacokinetics of oral direct thrombin and factor xa inhibitors in development. *Clin Pharmacokinet*. 2009;48(1):1-22.
71. Furugohri T, Isobe K, Honda Y, Kamisato-Matsumoto C, Sugiyama N, Nagahara T, Morishima Y, Shibano T. DU-176b, a potent and orally active factor Xa inhibitor: in vitro and in vivo pharmacological profiles. *J Thromb Haemost*. 2008 Sep;6(9):1542-9.
72. Bristol-Myers Squibb Investig. Brochure. 22 May 2006. Apixaban (BMS-562247)
73. Guillaume Paré, Niclas Eriksson, Thorsten Lehr, Stuart Connolly, John Eikelboom, Michael D. Ezekowitz, Tomas Axelsson, Sebastian Haertter, Jonas Oldgren, Paul Reilly, Agneta Siegbahn, Ann-Christine Syvanen, Claes Wadelius, Mia Wadelius, Heike Zimdahl-Gelling, Salim Yusuf and Lars Wallentin. Genetic Determinants of Dabigatran Plasma Levels and Their Relation to Bleeding Clinical Perspective. *Circulation*. 2013;127:1404-1412
74. Liesenfeld KH, Schäfer HG, Trocóniz IF, Tillmann C, Eriksson BI, Stangier J. Effects of the direct thrombin inhibitor dabigatran on ex vivo coagulation time in orthopaedic surgery patients: a population model analysis. *Br J Clin Pharmacol*. 2006;62:527-37.