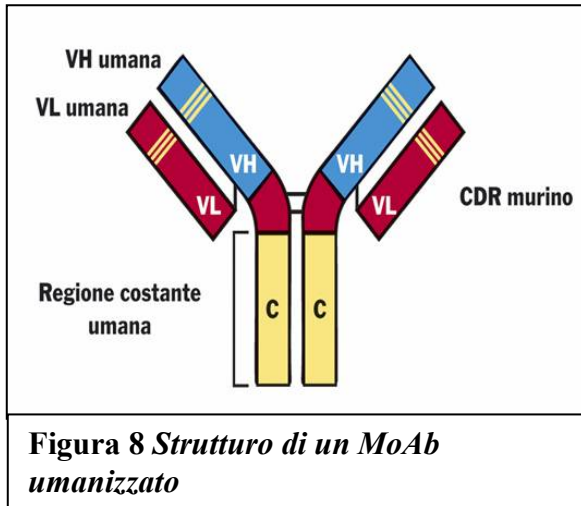


NATALIZUMAB

Il mAb umanizzato (**Figura 8**) diretto contro la subunità α (CD49d) del complesso integrinico VLA-4 (o $\alpha 4\beta 1$ integrina o complesso CD49d-CD29) prende il nome di natalizumab (Tysabri)^[78].

Inizialmente l'anticorpo prodotto era di origine murina; attualmente unicamente la CDR è di origine



murina: ciò riduce notevolmente la risposta anticorpale neutralizzante da parte del sistema immunitario umano nei confronti dell'anticorpo stesso.

Il principale meccanismo^[79,80,81] d'azione è quello di impedire l'adesione all'endotelio dei vasi, inclusi quelli della barriera emato-encefalica (**Figura 9**) da

parte dei leucociti che esprimono tale integrina. Inoltre, dato che l'integrina $\alpha 4$ favorisce

l'interazione tra linfocita e

APC, agendo come molecola

co-stimolatoria, è presumibile

che il legame di Natalizumab

con l'integrina $\alpha 4$ diminuisca

l'attivazione linfocitaria

modulando dunque

direttamente l'azione dei

linfociti attivati e riducendone il potenziale patogenico.

In seguito al legame delle molecole di adesione linfocitaria ai rispetti ligandi endoteliali avviene

dunque l'adesione e la diapedesi; la chemiotassi viene garantita dalla liberazione di chemochine,

mentre il superamento della membrana basale dell'endotelio si ritiene avvenga grazie alla

liberazione di metalloproteasi da parte dei linfociti.

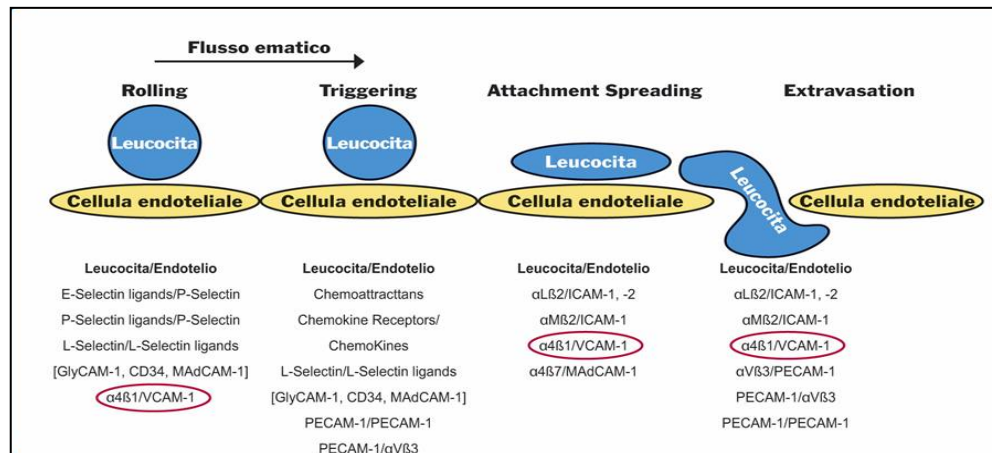


Figura 9 *Molecole di adesione dell'endotelio che permettono la diapedesi*

Seppur con minor affinità rispetto alla capacità di legame a VLA-4, natalizumab è in grado di interagire anche con fibronectina, determinando una diminuzione della capacità di diffusione nei tessuti, e osteopontina: quest'ultima interazione sarebbe responsabile dell'aumento della concentrazione periferica di cellule CD34+ (precursori emopoietici) che si riscontra nei pazienti trattati dopo le prime infusioni.

Infine, Natalizumab è in grado di bloccare la MAdCAM-1 ($\alpha 4\beta 7$ integrina) contribuendo anche con tale meccanismo alla diminuzione dell'adesione e della diapedesi leucocitaria.

Il principale meccanismo d'azione rimane comunque l'interazione con il VLA-4 espresso dalla quasi totalità dei leucociti. Dati recenti indicano che solo una minoranza di linfociti NK CD56dim, Linfociti T e B non esprime tale integrina. Al contempo è dimostrato che l'unica sottopopolazione linfocitaria che esprime in toto il CD49d è quella NK CD56bright.

Inoltre è stato dimostrato che la contemporanea presenza del CD49d e del CD29 non implica l'effettiva attività del complesso integrinico: il VLA-4 (**Figura 10**) infatti può essere presente sulla superficie cellulare in una conformazione a scarsa affinità per i ligandi (resting); solo fattori di attivazione che verosimilmente conducono ad un aumento del calcio intracellulare possono indurre l'attivazione di tale complesso che acquisisce la capacità di legare VCAM e fibronectina con un'affinità elevata. In definitiva, il ruolo del VLA-4 nel sistema immunitario è quello di consentire l'adesione cellulare favorendo la diapedesi del leucocita.

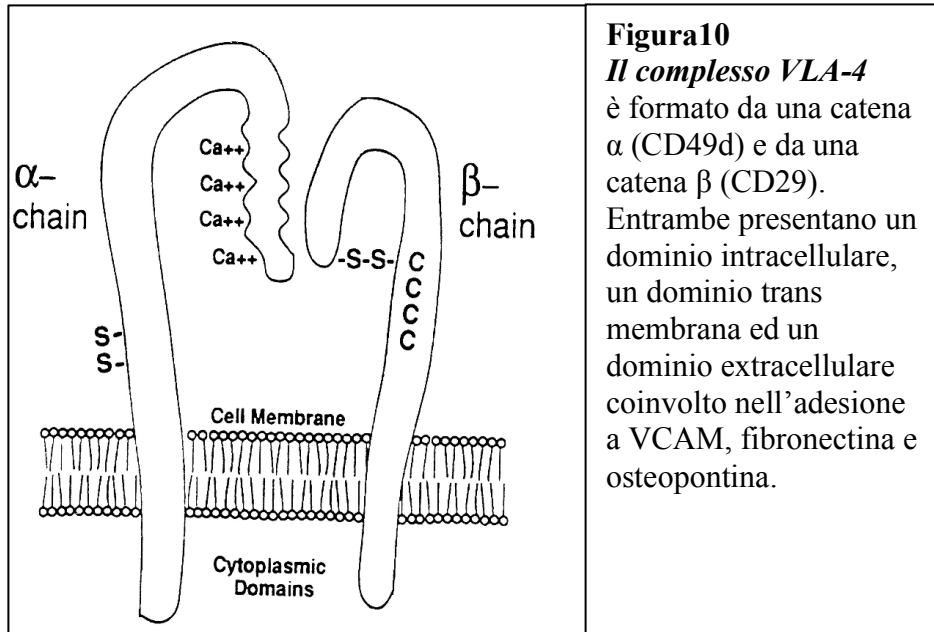


Figura10
Il complesso VLA-4
 è formato da una catena α (CD49d) e da una catena β (CD29). Entrambe presentano un dominio intracellulare, un dominio trans membrana ed un dominio extracellulare coinvolto nell'adesione a VCAM, fibronectina e osteopontina.

L'eterogeneità di espressione del VLA-4 nella popolazione linfocitaria, granulocitaria e monocitaria presente nel sangue periferico, rende difficile predire l'effetto del natalizumab sulle sottopopolazioni leucocitarie, che può essere quindi valutato solo con studi longitudinali in pazienti trattati

Meccanismo di azione nell'EAS

L'azione del natalizumab "in vivo" è stata inizialmente studiata in modelli murini di EAS.

Yednocke coll.^[82] hanno osservato che l'utilizzo di un anticorpo monoclonale anti-VLA-4, somministrato per via intraperitoneale, inibisce il legame dei monociti ai vasi cerebrali infiammati di topi con EAS e migliora significativamente il decorso della malattia stessa riducendo l'infiammazione e la demielinizzazione negli animali trattati.

Baron e coll.^[83] hanno osservato che la capacità di indurre l'EAS da parte di linfociti T specifici per la MBP è dipendente dalla capacità di esprimere alti livelli di integrina $\alpha 4$ e che questo correla con la capacità di queste cellule di infiltrare il SNC.

Kent e coll.^[85] hanno descritto l'effetto del natalizumab su parametri di RMN, in particolare l'abrogazione di ogni segno neuroradiologico di attività di malattia in animali con EAS.

Immunosorveglianza e Natalizumab

Il termine immunosorveglianza venne all'inizio utilizzato in campo oncologico per definire l'attività di riconoscimento di cellule neoplastiche non-self da parte del sistema immunitario. In immunologia tale concetto viene oggi generalizzato: l'immunosorveglianza è il processo mediante il quale cellule del sistema immunitario fuoriuscendo dal torrente circolatorio penetrano nei tessuti periferici, potendo qui riconoscere antigeni non-self e iniziare dunque la risposta immunitaria.

In condizioni fisiologiche l'immunosorveglianza del SNC è garantita dall'ingresso dei linfociti periferici dal sangue nel liquor cerebrospinale attraverso i plessi corioidei e, in minor misura, negli spazi sub aracnoidei. Nell'infiammazione, i linfociti attivati entrano nello spazio perivascolare del parenchima cerebrale attraversando la BEE e la lamina basale dell'endotelio cerebrale.

Secondo gli studi di Stüve e coll^[85] il Natalizumab determina una riduzione del numero di leucociti non solo a livello venoso, ma anche a livello del LCS. Inoltre gli stessi autori dimostrarono che tutte le sottopopolazioni linfocitarie sono presenti in minor concentrazione nel LCS dei pazienti trattati con tale mAb (**Figura 11**), con una diminuzione del rapporto tra linfociti T CD4+ e linfociti T CD8+.

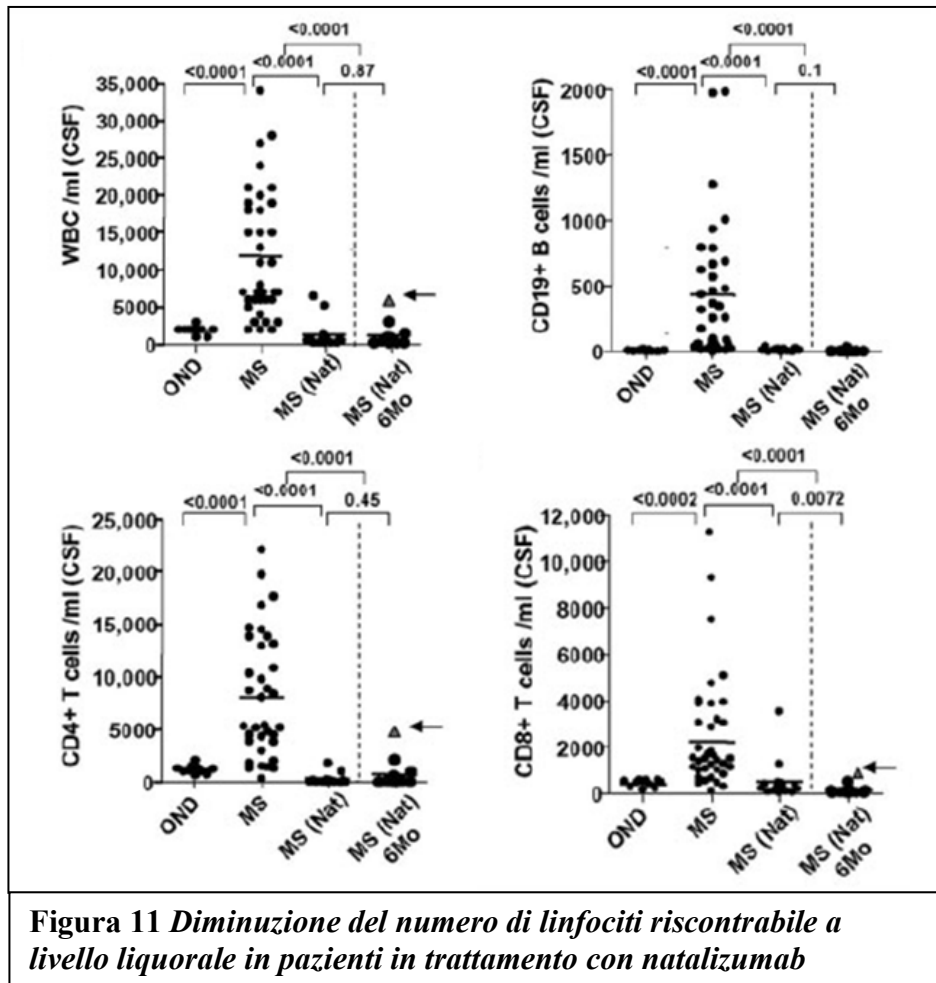


Figura 11 *Diminuzione del numero di linfociti riscontrabile a livello liquorale in pazienti in trattamento con natalizumab*

Indicazioni terapeutiche e controindicazioni

L'AIFA^[86] ha indicato che il natalizumab deve essere utilizzato solo in monoterapia e unicamente in due tipologie di paziente:

➤ Nel paziente con SMRR che non ha risposto ad un ciclo terapeutico completo e adeguato con le terapie immunomodulanti attualmente approvate per la SMRR.

Il paziente deve corrispondere alle seguenti caratteristiche:

- diagnosi di SMRR;
- trattamento con terapia immunomodulante per almeno dodici mesi (il periodo può essere inferiore se la mancata risposta al trattamento è chiaramente documentabile in un arco di tempo più breve);
- presenza di almeno due ricadute nel corso dell'ultimo anno in terapia, *oppure* presenza di una ricaduta nel corso dell'ultimo anno in terapia con incompleto recupero e disabilità residua non inferiore a 2 sulla EDSS;

- presenza di almeno nove lesioni in T2 alla RM, *oppure* presenza di almeno una lesione gadolinio-positiva (gad+) alla RM;

Tali circostanze definiscono il **criterio A** di inclusione

- Nel pazienti con SMRR grave a rapida evoluzione (anche non precedentemente trattati con farmaci immunomodulanti o immunosoppressori).

Il paziente deve corrispondere alle seguenti caratteristiche:

- diagnosi di SMRR;
- presenza di almeno due ricadute nel corso dell'ultimo anno con incompleto recupero e disabilità residua non inferiore a 2 sulla EDSS;
- comparsa di nuove lesioni in T2 (con riferimento a variazioni sia numeriche che volumetriche) rispetto a un esame RM eseguito non oltre dodici mesi prima, *oppure* comparsa di lesioni gad+ rispetto a un esame RM eseguito non oltre dodici mesi prima.

Tali circostanze definiscono il **criterio B** di inclusione versione.

Secondo le linee guida AIFA infine non devono mai essere sottoposti ad infusione di natalizumab i pazienti:

- che hanno dimostrato ipersensibilità a Tysabri
- che hanno sviluppato Leucoencefalopatia Multifocale Progressiva (LMP)
- con aumentato rischio di infezioni opportunistiche, compresi i pazienti immunocompromessi (sia quelli attualmente sottoposti a terapia immunosoppressiva, sia quelli immunocompromessi a causa di terapie precedenti, come mitoxantrone e ciclofosfamide)
- che si sono sottoposti a combinazione con IFN β o GA
- che presentano un tumore maligno in fase attiva i diagnosticato, eccetto i casi di epiteloma basocellulare
- di età inferiore ai 18 anni.

Modalità di somministrazione del farmaco e farmacocinetica

Il farmaco deve essere somministrato mediante infusione endovenosa ogni 28 giorni circa. La dose è di 300mg, inizialmente alla concentrazione di 20mg/ml; dopo diluizione (ovvero aggiunta di 100 ml di soluzione fisiologia 0,9% NaCl) la concentrazione diviene di 2,6 mg/ml.

La somministrazione del farmaco deve avvenire entro 8 ore dalla diluizione e deve durare all'incirca un'ora.

La clearance media è di $13,1 \pm 5,0$ ml/h, con un'emivita media di 16 ± 4 giorni. L'analisi degli effetti sulla farmacocinetica di varianti selezionate [quali il peso corporeo, l'età, il sesso, la funzione epatica e renale e la presenza di anticorpi (Ab) anti-natalizumab] ha dimostrato che soltanto il peso corporeo e la presenza di anticorpi anti-natalizumab influenzano la disponibilità di natalizumab. Tuttavia, mentre la modificazione della clearance indotta dal peso corporeo lascia inalterata l'efficacia clinica del farmaco, la presenza di Ab anti-natalizumab non solo aumenta la clearance modificando l'efficacia del trattamento, ma anche espone il paziente al rischio di reazione allergiche all'infusione (vedi poi, *effetti collaterali*).

Un presidio terapeutico utilizzabile per aumentare la clearance del farmaco è la plasmaferesi; questa elimina circa il 70-80% del farmaco totale dopo 3 cicli (nell'arco di 5-8 giorni): l'impatto della plasmaferesi sul ripristino della migrazione linfocitaria assume rilevanza clinica nel trattamento della LMP (vedi poi, *effetti collaterali*).

Reazioni correlate all'infusione^[86,87]

Viene definita “reazione correlata all'infusione” una reazione avversa che si è verifica durante l'infusione o entro l'ora seguente. Queste reazioni sono state osservate nel 23,1% dei pazienti con SM trattati con natalizumab (placebo: 18,7%). Le reazioni segnalate più frequentemente con natalizumab che con placebo comprendono *capogiri, nausea, orticaria e irrigidimenti*.

Bisogna inoltre considerare che il 4% dei pazienti trattati con natalizumab va incontro ad una reazioni di ipersensibilità che si manifestano con dolore toracico, ipotensione/ipertensione, fastidio

al torace, dispnea, angioedema, oltre a sintomi più comuni come esantema ed orticaria. Tuttavia in meno dell'1% dei pazienti si osservano reazioni anafilattiche/anafilattoidi.

Effetti collaterali

In studi controllati con placebo si sono osservati eventi avversi, che hanno portato all'interruzione della terapia nel 5,8% dei pazienti trattati con natalizumab (contro il 4,8% dei placebo). Il SNC, l'apparato gastrointestinale, le vie aeree superiori ed urinarie, l'apparato locomotore sono comunemente interessati da effetti collaterali (**Tabella II**)

Di particolare interesse è lo sviluppo di **Ab anti-natalizumab**, rilevabili nel 10% dei pazienti: nel 40% di questi rimane un reperto occasionale non confermabile al successivo controllo; nel 60% invece la positività viene confermata a distanza di 6 settimane, definendo una reale positivizzazione agli Ab anti-natalizumab. La persistenza degli anticorpi è associata ad una sostanziale diminuzione d'efficacia,

Tabella II Effetti collaterali ; le frequenze sono espresse come Comune (1-10%) e Non comune (0,1-1%)	
Patologie del sistema nervoso	
<i>Cefalea</i>	Comune
<i>Capogiri</i>	Comune
Patologie gastrointestinali	
<i>Vomito</i>	Comune
<i>Nausea</i>	Comune
Patologie del sistema muscolo scheletrico e del tessuto connettivo	
<i>Artralgia</i>	Comune
Infezioni ed infestazioni	
<i>Infezione delle vie urinarie</i>	Comune
<i>Rinofaringite</i>	Comune
Patologie sistemiche e condizioni relative alla sede di somministrazione	
<i>Irrigidimento</i>	Comune
<i>Piressia</i>	Comune
<i>Affaticamento</i>	Comune
Disturbi del sistema immunitario	
<i>Orticaria</i>	Comune
<i>Sviluppo Ab Anti-Natalizumab</i>	Comune

<i>Persistenza Ab Anti-Natalizumab</i>	Non comune
--	------------

correlabile con l'aumentata clearance, e ad un aumento dell'incidenza di reazioni di ipersensibilità.

Per tali ragioni il trattamento deve essere interrotto nei pazienti che sviluppano anticorpi persistenti.

Correlati all'infusione del tysabri, sono stati evidenziati gravi **danni epatici**, con innalzamento degli enzimi epatici e iperbilirubinemia.

Non sono state invece osservate differenze nei tassi d'incidenza o nella natura delle **patologie maligne** tra i pazienti trattati con natalizumab e quelli trattati con placebo durante 2 anni di trattamento. Tuttavia è necessario effettuare un'osservazione per un periodo di trattamento più lungo prima di potere escludere un effetto del natalizumab sulle patologie maligne.

Il trattamento con natalizumab è inoltre associato ad un aumento del numero dei **linfociti**, dei monociti, degli eosinofili, dei basofili e degli eritrociti nucleati circolanti. Non è stato osservato un aumento dei neutrofili. Durante il trattamento con natalizumab, sono state osservate lievi diminuzioni dell'emoglobina, dell'ematocrito e della conta degli eritrociti. Entro la 16^a settimana dopo l'ultima somministrazione, tutti i valori ritornano nella norma e le alterazioni non sono state associate a sintomi clinici.

Lo sviluppo di **infezioni** a carico delle vie aeree superiori e urinarie è di circa l'1,5 per paziente-anno sia nei pazienti trattati con natalizumab sia in quelli trattati con placebo. La natura delle infezioni è solitamente simile nei due gruppi di pazienti.

In alcuni studi sono stati segnalati casi di ulteriori infezioni opportunistiche, alcune delle quali ad esito fatale, mentre le infezioni da herpes (virus varicella-zoster, virus herpes simplex) sono state osservate con frequenza lievemente maggiore nei pazienti trattati con natalizumab rispetto a quelli trattati con placebo.

La maggior parte dei pazienti è andata incontro a risoluzione del quadro infettivo mediante terapia appropriata con conseguente prosecuzione delle infusioni di natalizumab.

Sono stati inoltre segnalati casi di LMP. Tale patologia è dovuta alla riattivazione di un papovavirus, il virus JC (JCV). Circa il 75% degli adulti sani presenta Ab-anti JCV e tale percentuale aumenta con l'età. L'infezione primaria è acquisita verosimilmente per via orale ed è clinicamente irrilevante; l'infezione latente viene stabilita dal JCV nei Linfociti B, nel rene e negli oligodendrociti. La riattivazione determina una lisi cellulare e dunque comparsa di lesioni demielinizzanti a carico del SNC che tendono a confluire. La diagnosi si pone mediante valutazione clinica, nonché approfondimento radiologico e laboratoristico. Clinicamente la riattivazione si manifesta con stato confusionale, atteggiamenti aggressivi, decadimento cognitivo, paresi ed atassia. Alla RMN si rilevano alterazioni asimmetriche della sostanza bianca specie dei lobi occipitali, tipicamente non captanti contrasto, caratteristica che permette di escludere la natura neoplastica della lesione. L'esame liquorale infine non evidenzia alterazioni biochimiche; è possibile però ricercare il JCV-DNA mediante polymerase chain reaction (PCR) che si ritrova nella maggior parte dei pazienti. Nei casi di negatività al JCV-DNA liquorale si può procedere con biopsia cerebrale con ricerca del JCV negli oligodendrociti.

Il decorso di tale patologia è rapidamente fatale. Solo se la diagnosi è precoce vi può essere un approccio terapeutico. In questo caso l'unico presidio di efficacia dimostrata nei pazienti in terapia con natalizumab che sviluppano la LMP è la plasmateresi; la somministrazione di farmaci antivirali in aggiunta alla plasmateresi è attualmente in sperimentazione.

Ad ora non vi è alcun marcatore del rischio di sviluppare la LMP. La ricerca del JCV-DNA a livello ematico non è correlabile al rischio di sviluppare la LMP.

Si deve infine considerare che ad oggi si sono registrati 58 casi di LMP nel mondo (32 in Europa, 22 in America); inoltre, il rischio di sviluppare tale patologia è direttamente proporzionale al numero di infusioni del farmaco. Si stima infatti che la probabilità nel primo anno è pari allo 0,15%, nel secondo allo 0,35%, nel terzo all'1,47 %.