



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE PEDIATRICHE - XXIII CICLO

COORDINATORE: PROF. G. SORGE

DOTT.SSA BARBAGALLO MARIA LUISA

STUDIO ESTESO POLICENTRICO SU PHENOPTIN™

(IDROCLORURO DI SAPROPTERINA)

IN SOGGETTI AFFETTI DA FENILCHETONURIA

TESI DI DOTTORATO

TUTOR

CHIAR.MO PROF. G. SORGE

ANNO ACCADEMICO 2010-11

INDICE

Introduzione

Parte I

La Fenilchetonuria:

1. Premessa

2. Cenni di biochimica:

LA REAZIONE DI IDROSSILAZIONE DELLA FENILALANINA

IL RUOLO BIOCHIMICO DELLA TETRAIDROBIOPTERINA

LE IPERFENILALANINEMIE DA DIFETTO DI TETRAIDROBIOPTERINA

LA STORIA DELLA SCOPERTA, L'INVENZIONE DEL TRATTAMENTO DIETETICO, LO SCREENING NEONATALE

LA TERAPIA DIETETICA

NUOVE PROSPETTIVE DI TRATTAMENTO

Parte II

La sperimentazione clinica:

STUDIO ESTESO POLICENTRICO SU PHENOPTIN™ (IDROCLORURO DI SAPROPTERINA)

IN SOGGETTI AFFETTI DA FENILCHETONURIA

Bibliografia

Introduzione

La fenilchetonuria rappresenta la più frequente e nota malattia metabolica ereditaria. Essa venne descritta per la prima volta nel 1934 dal pediatra norvegese Asbjorn Folling, che la definì 'oligofrenia fenilpiruvica', termine che riassumeva l'associazione tra il ritardo mentale e la presenza di acido fenilpiruvico nelle urine di questi pazienti. Il termine 'fenilchetonuria' venne utilizzato successivamente e deriva dalla caratteristica presenza, nelle urine dei soggetti affetti, dei fenilchetoni (acido fenilpiruvico, fenilattico e fenilacetico), composti chimici derivanti da un eccesso di fenilalanina nel sangue. Nell'arco di qualche decennio dalla scoperta di Folling la ricerca scientifica ha definito le basi biochimiche della fenilchetonuria, identificando nel difetto funzionale, su base genetica, dell'enzima fenilalanina idrossilasi la causa della mancata idrossilazione della fenilalanina in tirosina, con conseguente iperfenilalaninemia che rappresenta la causa del danno cerebrale nella fenilchetonuria. Gli elevati livelli di fenilalanina sono infatti alla base della patogenesi del danno interferendo con la normale sintesi della mielina.

Nel 1951 il pediatra inglese Horst Bickel mise a punto una strategia terapeutica per la prevenzione del danno mentale della fenilchetonuria. Egli elaborò infatti una dieta a ridotto apporto alimentare di fenilalanina, aminoacido costituente di tutte le proteine, che dovevano essere assunte in maniera 'controllata' dai pazienti affetti da fenilchetonuria.

Lo scopo della dieta era quello di fare abbassare i livelli di fenilalanina nel sangue allo scopo di prevenire il danno cerebrale altrimenti indotto dall'iperfenilalaninemia.

Il trattamento dietetico inventato da Bickel diede subito degli ottimi risultati ed è stato finora considerato l'unico trattamento terapeutico valido per la cura della fenilchetonuria.

Tuttavia, la dieta, con il suo rigore, presenta dei risvolti psicologici di notevole entità ed in taluni casi la non accettazione da parte della famiglia e del soggetto fenilchetonurico adolescente.

Nell'ultimo decennio, l'obiettivo della ricerca scientifica è stato quello di trovare trattamenti alternativi alla dieta per la cura della fenilchetonuria. Nei primi anni del 2000 l'attenzione degli studiosi si è spostata sulla possibilità di impiego del cofattore enzimatico tetraidrobiopterina o BH4 dell'enzima fenilalanina idrossilasi, quale strategia terapeutica alternativa alla dietoterapia. Alla fine degli anni Novanta, infatti, sono stati descritti per la prima volta in letteratura pazienti affetti da Fenilchetonuria che avevano mostrato una diminuzione significativa dei livelli plasmatici di fenilalanina dopo l'assunzione orale di BH4. Ciò aveva consentito la liberalizzazione della dieta. Il razionale scientifico della risposta positiva alla somministrazione della BH4 è da ricondurre alle condizioni genetiche del paziente, caratterizzate da mutazioni del gene PAH che danno origine ad un enzima la cui attività enzimatica viene potenziata in presenza del suo coenzima BH4 ad alte dosi.

Dal momento che la BH4 non esisteva come farmaco si è reso indispensabile avviare uno studio clinico mondiale allo scopo di sperimentare e valutare l'efficacia e la sicurezza della molecola utilizzata.

La casa farmaceutica americana Biomarin ha prodotto tale molecola con il nome di Phenoptin (idrocloreuro di sapropterina) e l'ha distribuito ai Centri che hanno preso parte alla sperimentazione.

La Clinica Pediatrica dell'Università di Catania è stata coinvolta in questo studio clinico multicentrico mondiale.

La prima parte di questa tesi descrive la fenilchetonuria, la sua scoperta, le basi biochimiche della malattia e le diverse forme cliniche derivanti dai difetti funzionali degli enzimi coinvolti nella via metabolica della fenilalanina, nonché i principi del trattamento dietoterapeutico e le nuove prospettive di terapia.

Nella seconda parte di questa tesi riportiamo i risultati dello studio pilota condotto negli anni 2005-2009 che ha coinvolto anche i pazienti fenilchetonurici seguiti presso la Clinica Pediatrica di Catania.

1. Premessa

Tutte le proteine che introduciamo quotidianamente con gli alimenti contengono, in quantità variabile, l'aminoacido fenilalanina definito essenziale poiché l'organismo dell'uomo non è in grado di sintetizzarlo.

La fenilalanina proveniente dalla digestione delle proteine ingerite con il cibo, dopo essere stata assorbita dall'intestino, viene convogliata nel fegato dove va incontro al proprio 'destino metabolico'. Essa è indispensabile per la sintesi di nuove proteine, ma la via metabolica più importante è quella che conduce, attraverso una reazione biochimica di idrossilazione, alla sintesi di tirosina, aminoacido precursore di importanti neurotrasmettitori, quali la dopamina, la noradrenalina e l'adrenalina e che conduce inoltre alla sintesi di ormoni tiroidei e di melanina. La reazione di idrossilazione della fenilalanina in tirosina è catalizzata dall'enzima *fenilalanina idrossilasi (PAH)* e dal suo coenzima, il cofattore enzimatico *tetraidrobiopterina (BH4)*.

Il difetto funzionale, su base genetica, dell'enzima PAH dà origine alla fenilchetonuria, che rappresenta la più frequente e nota malattia metabolica ereditaria.

Il difetto funzionale del cofattore BH4 dà origine ad un gruppo di malattie, definite per l'appunto "iperfenilalaninemie da difetto di cofattore BH4", che sviluppano quadri clinici diversi rispetto a quello della fenilchetonuria.

Per la comprensione delle diverse forme cliniche derivanti dal difetto di PAH o dal difetto di BH4 è necessario un breve approfondimento delle basi biochimiche del metabolismo della fenilalanina.

2. CENNI DI BIOCHIMICA:

2.1. LA REAZIONE DI IDROSSILAZIONE DELLA FENILALANINA IN TIROSINA

La reazione di idrossilazione della fenilalanina in tirosina, schematizzata nella **Fig. 1**, nell'uomo si svolge esclusivamente a livello epatico. E' una reazione biochimica complessa che, oltre a coinvolgere l'enzima PAH, richiede l'azione del cofattore enzimatico BH₄.

La BH₄ in presenza di NADPH e di ossigeno molecolare O₂ coopera alla idrossilazione della fenilalanina ossidandosi a BH₂.

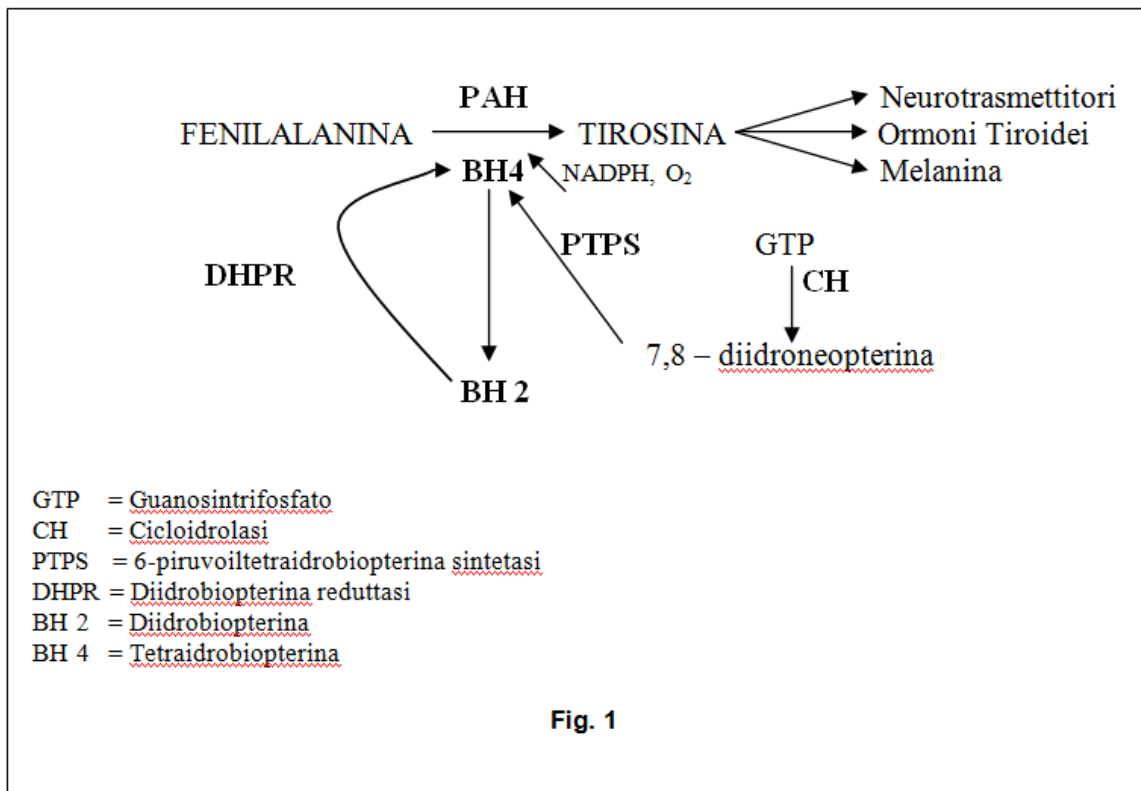


Fig. 1

La BH₂ viene nuovamente ridotta a BH₄ dall'enzima *diidrobiopterina reductasi* o *DHPR*. La riduzione della BH₂ a BH₄ viene definita "*via di rigenerazione della BH₄*". La "*via di sintesi della BH₄*" può essere riassunta così come segue:

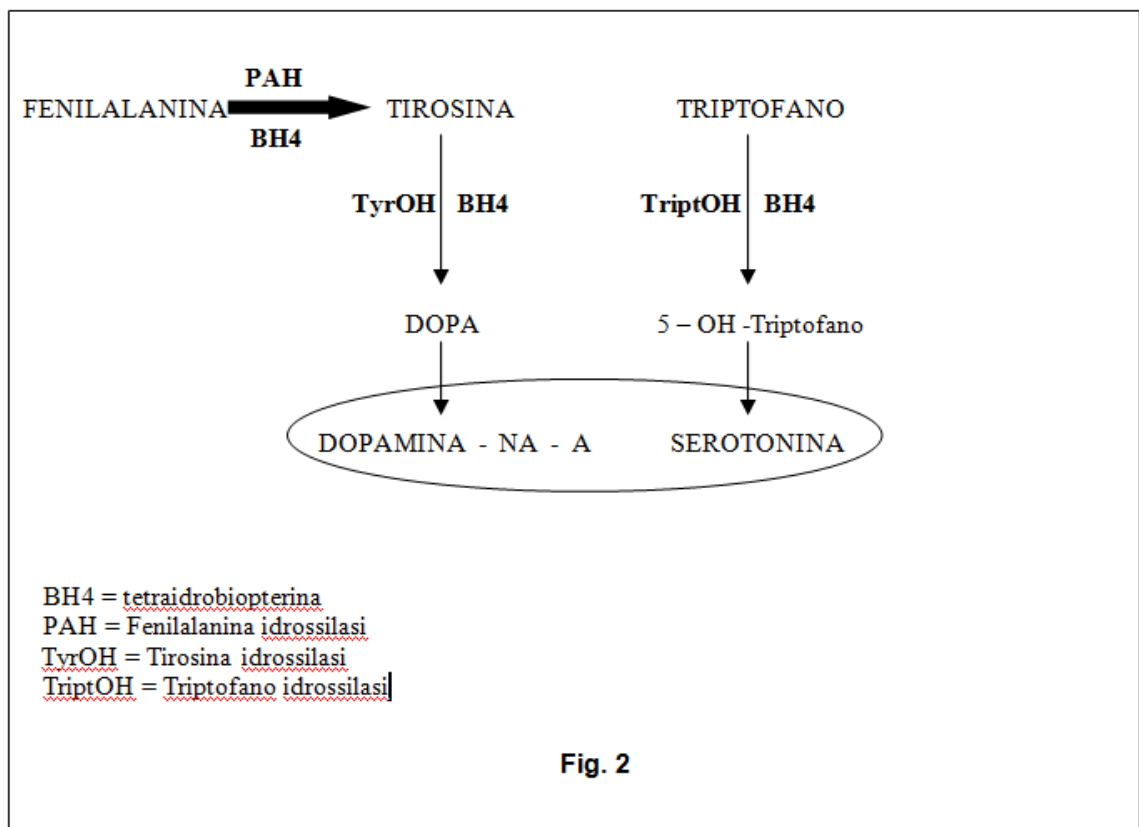
- formazione di 7,8- diidroneopterina a partire dal GTP per opera dell'enzima GTP-cicloidrolasi o CH;

- sintesi di BH4 a partire dalla 7,8 - diidroneopterina per azione dell'enzima 6, - piruvoltetraidrobiopterina sintetasi o PTPS.

2.2. IL RUOLO BIOCHIMICO DELLA 5,6,7,8 - TETRAIDROBIOPTERINA O BH4

La Tetraidrobiopterina o BH4 oltre ad essere il coenzima della fenilalanina idrossilasi è il cofattore comune ad altre idrossilasi, enzimi definiti anche *monoossigenasi* oppure *ossigenasi a funzione mista*.

La BH4 è infatti il coenzima della tirosina idrossilasi e della triptofano idrossilasi nelle reazioni che conducono alla sintesi di importanti neurotrasmettitori quali la Dopa, la Dopamina, l'Adrenalina, la Noradrenalina e la Serotonina, così come schematizzato nella **Fig. 2**.



L'alterazione dell'omeostasi della BH4 non compromette pertanto solo idrossilazione della fenilalanina, ma anche quella della tirosina e del triptofano, con conseguente ipofenilalaninemia (HPA) e grave deficit di neurotrasmettitori,

responsabili della grave sintomatologia neurologica che si viene a determinare nel caso di difetto funzionale di uno degli enzimi coinvolti nella via di sintesi o in quella di rigenerazione della BH4.

2.3 LE IPERFENILALANINEMIE DA DIFETTO DI TETRAIDROBIOPTERINA O BH4

Attualmente si conoscono diverse malattie metaboliche ereditarie che derivano dal difetto funzionale di uno degli enzimi coinvolti nella via di sintesi o in quella della rigenerazione della BH4. Esse sono:

- il deficit di *GTP-Cicloidrolasi (CH)*
- il deficit di *6-piruviltetraidrobiopterina sintetasi (PTPS)*
- il deficit di *diidrobiopterina reduttasi (DHPR)*
- il difetto di *didrocarbinolamina deidratasi (PCDH)*

Il quadro clinico che si viene a determinare nelle iperfenilalaninemie (HPA) da deficit di cofattore BH4 è sovrapponibile per tutti i deficit enzimatici GTP-CH, PTPS e DHPR, ad esclusione del deficit di PCDH, che non comporta sintomatologia clinica in quanto non compromette l'omeostasi della BH4.

Nel caso dei difetti di GTP-CH, PTPS e DHPR la sintomatologia clinica è caratterizzata da compromissione neurologica gravissima ed il soggetto affetto può giungere ad exitus se non si interviene con un tempestivo intervento terapeutico.

I neonati affetti da difetto di BH4 alla nascita sono normali, così come nel caso della Fenilchetonuria. A differenza delle HPA da deficit di idrossilasi, la sintomatologia clinica dei difetti di BH4 è più precoce, insorgendo, in genere intorno al 3° mese di vita, una grave ipotonia assiale ed ipertono delle estremità. Altri segni caratteristici sono le crisi oculogire, le convulsioni miocloniche, la scialorrea intensa

da difetto della deglutizione e le infezioni ricorrenti. Se non si interviene con un tempestivo trattamento terapeutico i neonati vanno incontro a grave compromissione neurologica e morte entro i primi anni di vita.

Risulta pertanto di fondamentale importanza diagnosticare precocemente i soggetti affetti da HPA da difetto di BH4.

La diagnosi di HPA da difetto di BH4 si avvale di una serie di accertamenti non invasivi, che prevedono l'analisi delle pterine urinarie ed il test da carico orale con BH4, quest'ultimo per verificare la modificazione del tasso plasmatico della fenilalanina dopo somministrazione di BH4.

Gli accertamenti invasivi riguardano il dosaggio dei neurotrasmettitori liquorali e quindi è indispensabile il prelievo di liquido cefalorachidiano. E' pur vero che il dosaggio dei neurotrasmettitori e dei loro cataboliti può essere eseguito sulle urine, ma nel caso di forte sospetto diagnostico è indispensabile effettuare l'analisi su liquido cefalorachidiano.

La diagnosi di conferma del difetto di BH4 si avrà con il dosaggio delle attività enzimatiche della GTP-CH, della PTPS e della DHPR, che può essere eseguita su leucociti, sui fibroblasti o anche sugli eritrociti.

L'*analisi delle* pterine urinarie viene eseguita su un campione di urine opportunamente raccolte al buio, onde evitare l'ossidazione delle sostanze da analizzare. Essa viene eseguita mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). I vari metaboliti pterinici sono dosabili in tutti i liquidi biologici mediante HPLC. Tuttavia a scopo diagnostico si utilizza l'analisi su urina presentando tutti e tre i difetti enzimatici del deficit di BH4 profili urinari caratteristici, ben evidenziati dalla differente eliminazione dei metaboliti maggiori e cioè la **Neopterina** (*derivata dalla 7,8 diidroneopterina*) e dalla **Biopterina** (*derivata dalla BH2 o diidrobiopterina*), così come riportato nella Fig. 3.

Nel difetto di Cicloidrolasi (CH), a causa del precoce blocco metabolico si ritrovano nell'urina solo tracce di Pterine, con rapporto Neopterina/Biopterina pari a 1, cioè uguale a quello del soggetto sano.

Nel difetto di 6-piruviltetraidrorbiopterina sintetasi (PTPS) è molto elevata la concentrazione urinaria di Neopterina, molto bassa quella di Biopterina, con rapporto Neopterina/Biopterina sempre superiore a 6.

Il difetto di diidrobiopterina reduttasi (DHPR) è caratterizzato da elevata escrezione urinaria di Biopterina, con Neopterina normale o lievemente aumentata, risultandone un rapporto Neopterina/Biopterina inferiore a 0,2.

L'escrezione dei metaboliti pterinici nella Fenilchetonuria Classica evidenzia elevate concentrazioni urinarie sia di Neopterina che di Biopterina.

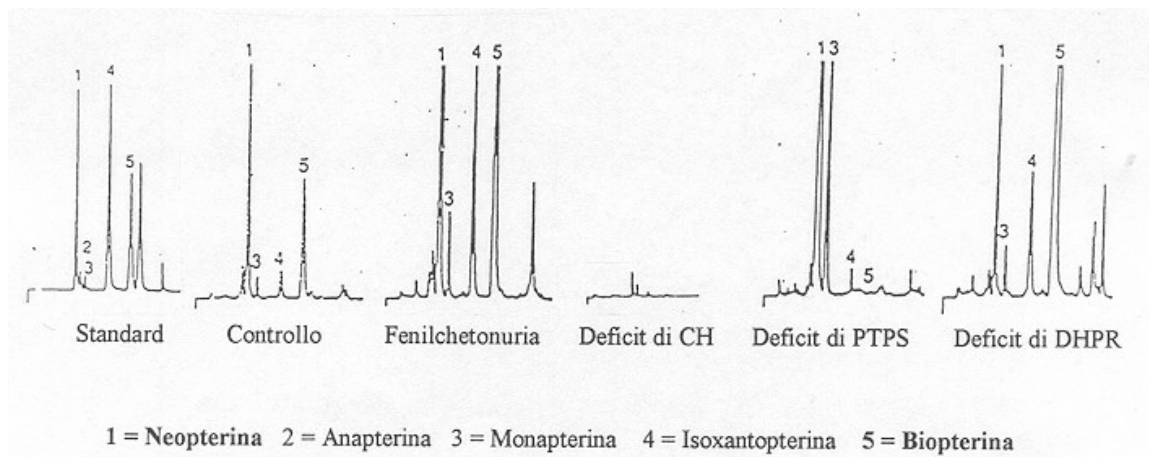


Fig. 3

Il Test da carico orale con BH4 si effettua somministrando al paziente BH4-bicloridrata nella dose di 20 mg/Kg in bolo rapido (usualmente viene somministrata al neonato per gavage). Ciò produce nei soggetti carenti di BH4 la normalizzazione dei livelli plasmatici di fenilalanina. Vengono dunque effettuati due prelievi, a distanza di 4 e 8 ore dal carico per il dosaggio quantitativo della fenilalaninemia. Il dosaggio dei Neurotrasmettitori o i loro cataboliti acido omovanillico e acido 5-idrossiindolacetico può essere eseguito sulle urine. Tuttavia la valutazione liquorale è essenziale per stabilire le indicazioni terapeutiche.

La terapia dei difetti di BH4 si avvale di un trattamento farmacologico sostitutivo a base di neurotrasmettitori sintetici somministrati *per os* insieme ad alte dosi di BH4 sintetica. Questa terapia deve essere iniziata entro le prime settimane di vita e

continuata per tutta la vita. L'obiettivo terapeutico dei difetti di BH4 è la prevenzione del danno neurologico correlato alla carenza neurotrasmettitoriale.

I migliori risultati si ottengono con la somministrazione di precursori dei neurotrasmettitori (L-Dopa e 5-OH-Triptofano) associati ad un inibitore periferico delle decarbossilas, la carbidopa, che non supera la barriera ematoencefalica, ottenendo così una migliore disponibilità cerebrale.

La prognosi dei difetti di BH4 è strettamente dipendente dall'età in cui viene posta la diagnosi e quindi iniziato il trattamento terapeutico sostitutivo. Dal momento che si tratta di patologie di recente identificazione non vi è a tutt'oggi una così ampia casistica che possa valutare la prognosi a lungo termine.

2.4 LA FENILCHETONURIA: LA SCOPERTA, IL TRATTAMENTO DIETETICO, LO SCREENING NEONATALE.

Il difetto funzionale dell'enzima PAH dà origine alla Fenilchetonuria, malattia certamente più nota rispetto alle forme cliniche finora descritte, dei difetti di tetraidrobiopterina.

Nel 1934 il pediatra norvegese, il dr. Asbjørn Følling, descrisse per primo la fenilchetonuria. Infatti, una giovane madre sottopose alla visita del medico i suoi due bambini, di 4 e 7 anni, entrambi affetti da ritardo mentale grave e che presentavano, inoltre, un insolito odore delle urine, cosa che nessun medico era stato capace di spiegare. Il dr. Følling eseguì varie prove sui bambini, tra le quali un'analisi chimica sulle urine. Il loro insolito odore lo condusse ad analizzarle applicando un test – lo stesso che veniva utilizzato per il controllo del diabete – in grado di controllare la presenza di talune sostanze chimiche: i chetoni. La prova produsse un risultato inatteso e mai osservato prima. Anziché colorarsi di rosso, come normalmente avviene per le urine dei pazienti diabetici, il campione di urina dei due fratellini assunse una colorazione blu-verde. Con un'ulteriore analisi chimica, il dr. Følling riuscì ad identificare che cosa avesse causato la colorazione nel campione e, con particolari studi chimici, identificò il chetone presente nelle urine dei due bambini. Si trattava di un fenilchetone, prodotto dalla degradazione della fenilalanina, noto come 'acido fenilpiruvico'.

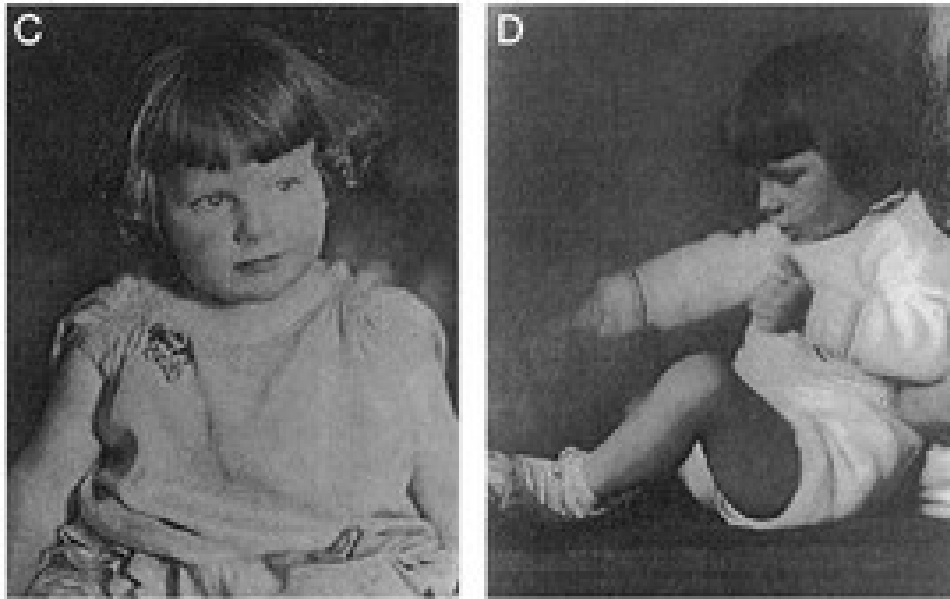
Følling chiamò inizialmente questa malattia 'Demenza Fenilpiruvica'. Un anno dopo, il dr. Lionel Sharples Penrose gli darà il nome che conosciamo oggi di 'fenilchetonuria', che indica, per l'appunto, la presenza di fenilchetoni nelle urine.



Ivar Asbjørn Følling (1888-1973)

Il dr. Følling sviluppò una teoria per spiegare la presenza dei fenilchetoni nelle urine dei bambini, ipotizzando che questi non fossero capaci di metabolizzare la fenilalanina, e nei suoi tentativi di convertire artificialmente la fenilalanina in acido fenilpiruvico, trovò un metodo per misurarne i livelli.

Questa prova gli permise di confermare la sua teoria controllando i livelli di fenilalanina nel sangue dei due bambini. Verificato che i livelli erano particolarmente elevati, cominciò ad esaminare altri pazienti mentalmente handicappati e con questo primo screening, scoprì altri soggetti che avevano alti livelli di fenilalanina nel sangue e fu capace di diagnosticare così la malattia in numerosi altri pazienti. Ulteriori studi permisero di individuare ben presto la possibilità di trattare il problema riducendo l'apporto di fenilalanina, ovvero intervenendo sulla dieta dei pazienti.



**Il primi bambini con fenilchetonuria (Liv, 7 anni e Dag, 4 anni)
diagnosticati dal dr. Følling nel 1934.**

Nel 1937 il dr. George Jervis, negli Stati Uniti, scoprì la causa degli alti livelli di fenilalanina nei pazienti con fenilchetonuria. Egli condusse il seguente esperimento: somministrò ad un gruppo di soggetti normali una dose di fenilalanina che portò, come ci si aspettava, ad un aumento del livello di tirosina nel loro sangue. Ripetendo la stessa somministrazione in un gruppo di pazienti con fenilchetonuria, i livelli di tirosina non cambiavano. Normalmente, la fenilalanina è convertita in tirosina e come tale entra in circolo nell'organismo. Da questi risultati, il dott. Jervis dedusse che nei pazienti con fenilchetonuria, la normale conversione della fenilalanina in tirosina non avveniva. Con successivi studi, il dr. Jervis dimostrò che l'enzima responsabile della conversione della fenilalanina in tirosina, che prende il nome di fenilalanina idrossilasi, nei pazienti con fenilchetonuria aveva subito una mutazione e non compiva perciò la conversione come necessario. Il grado di mutazione di questo enzima determina il livello di gravità della fenilchetonuria. Infatti, nei casi definiti 'fenilchetonuria classica', nei quali i livelli di fenilalanina nel sangue sono molto elevati, l'enzima ha subito una mutazione più severa e dunque la sua funzione è del tutto compromessa. Invece, nei casi di fenilchetonuria definita moderata o lieve,

l'enzima ha subito una mutazione meno severa, con conseguente parziale attività enzimatica. I soggetti affetti da queste varianti di fenilchetonuria mostrano, a dieta libera, livelli di fenilalanina più bassi rispetto ai soggetti affetti dalla forma classica e dovranno seguire ugualmente una dieta, ma con una minore restrizione alimentare. Qualora l'attività enzimatica sia solo lievemente compromessa si è di fronte alla condizione più lieve, in assoluto, di fenilchetonuria, definita Iperfenilalaninemia, caratterizzata solo da un modico aumento del tasso di fenilalanina nel sangue, che non necessita di alcun trattamento dietetico poiché, a dieta libera, non si raggiungono mai livelli di fenilalanina tossici per il sistema nervoso. Nello schema qui di seguito riportato vengono classificate le diverse forme di fenilchetonuria in base ai livelli di fenilalanina presenti nel sangue al momento della diagnosi e alla tolleranza dietetica individuale*.

	TASSO DI FENILALANINA NEL SANGUE A DIETA LIBERA	TOLLERANZA DIETETICA INDIVIDUALE GIORNALIERA VERSO LA FENILALANINA
FENILCHETONURIA 'CLASSICA'	Oltre 25 mg/dl	250 mg al giorno
FENILCHETONURIA 'MODERATA'	Tra 20 mg/dl e 25 mg/dl	300-350 mg al giorno
FENILCHETONURIA 'LIEVE'	Maggiore di 8 mg/dl, ma inferiore a 20 mg/dl	400 - 1000 mg al giorno
IPERFENILALANINEMIE	Maggiore di 2 mg/dl, ma inferiore a 8 mg/dl	Dieta libera

* La **tolleranza dietetica individuale** giornaliera verso la fenilalanina indica la quantità massima giornaliera di fenilalanina che il paziente fenilchetonurico può tollerare allo scopo di mantenere livelli plasmatici di fenilalanina compresi tra 2 e 6 mg/dl, "range" ritenuto oggi di sicurezza per la prevenzione del danno mentale altrimenti indotto dagli alti livelli ematici di fenilalanina.

Con questo schema è così possibile differenziare pazienti affetti da fenilchetonuria classica da quelli affetti da forme di fenilchetonuria più lieve o moderata, sulla base della tolleranza dietetica individuale verso la fenilalanina introdotta con la dieta e in base al valore iniziale di fenilalaninemia.

Nel 1951, il prof. Horst Bickel, in Inghilterra, comincia a lavorare sulla prima dieta povera in fenilalanina. Egli la somministrò per la prima volta ad una ragazza diciassettenne, con severo ritardo mentale, nella quale egli stesso aveva diagnosticato in precedenza la fenilchetonuria. La madre della ragazza appoggiò con entusiasmo tale iniziativa nella speranza di potere migliorare la condizione disperata di sua figlia. La dieta diede buoni risultati dal punto di vista metabolico poiché si ebbe, infatti, una notevole riduzione del tasso ematico della fenilalanina. Tuttavia, le condizioni cliniche della ragazza, purtroppo, non migliorarono. Pur nondimeno, la possibilità di ridurre i livelli ematici della fenilalanina con la dieta 'inventata' dal prof. Bickel e resa pubblica alle autorità mediche nel 1953, fu ritenuta un successo.

Occorreva adesso mettere a punto un test per l'individuazione precoce dei soggetti affetti da fenilchetonuria, allo scopo di iniziare il trattamento dietetico proposto da Bickel prima che il danno cerebrale si fosse già determinato.

Ulteriori prove confermarono infatti che la dieta iniziata quando sono già evidenti i danni neurologici causati dagli alti livelli di fenilalanina ematica, pur riducendo considerevolmente il tasso ematico di fenilalanina, non modifica infatti, sostanzialmente, il quadro clinico della malattia.

Per questo motivo il dr. Willard Centerwall di Los Angeles, nel 1957, iniziò la ricerca per trovare un test rivelatore di fenilchetonuria prima che si fossero determinati i danni al cervello. Egli scoprì che applicando cloruro di ferro al pannolino bagnato di un bambino con fenilchetonuria, si sarebbe ottenuto una colorazione verde, una prova molto simile a quella sviluppata molti anni prima dal dr. Følling. Anche se questo test era attendibile poiché era in grado di evidenziare i neonati affetti da fenilchetonuria, tuttavia esso aveva dei limiti come ad esempio il fatto che occorrevano molte settimane ancora, dopo la nascita, per avere la presenza dei fenilchetoni urinari e dunque risultava oggettivamente difficoltoso

estendere questo test a tutti i nuovi nati, in considerazione del fatto che dopo qualche giorno avevano già lasciato il reparto maternità. Occorreva dunque mettere a punto un test in grado di evidenziare il neonato affetto da fenilchetonuria nei primi giorni di vita, da applicare nell'ambito di tutti i punti-nascita del territorio. Con questa nuova ottica si aprì la ricerca che da lì a poco condusse alla scoperta di un test sensibile, pratico ed efficace, che permetteva la diagnosi di fenilchetonuria nei primi giorni di vita: il "Test di Guthrie".

Nel 1958, infatti, un giovane medico ricercatore, il dr. Robert Guthrie, mentre lavorava su un progetto sul cancro, mise a punto un metodo in grado di misurare la fenilalanina ematica su poche gocce di sangue raccolte ed essiccate su di un pezzo di carta-bibula*. Questo segnò la svolta nella storia della fenilchetonuria. Era stato finalmente realizzato il test che permetteva l'individuazione precoce della malattia e che venne divulgato, in tutto il mondo, come "Test di Guthrie", dal nome del suo scopritore.



Robert Guthrie (1916-1995)

* La carta-bibula è una particolare carta assorbente che si usa nello screening neonatale.

Il metodo ideato dal dr. Guthrie era infatti attendibile, efficace, pratico ed economico e poteva così essere applicato ad ogni neonato prima della sua dimissione dal punto-nascita.

La peculiarità del test di Guthrie consiste nella praticità di raccolta del sangue negli appositi cartoncini che possono essere facilmente riposti dentro una busta ed inviati per posta al Centro di screening.

Tra il 1960 ed il 1964 il test di Guthrie venne adottato nella maggior parte delle maternità americane e nel 1965 fu reso obbligatorio nello stato di New York.

Fu così che nacque il primo programma di “screening neonatale di massa” per la prevenzione della fenilchetonuria.

Ben presto altre Nazioni seguirono l'esempio dato dallo stato di New York e così, intorno agli anni Settanta, i programmi di screening neonatale per la fenilchetonuria si diffusero rapidamente in tutto il mondo.

In Italia il primo programma regionale per lo screening neonatale della fenilchetonuria venne realizzato nel 1972 nella regione Liguria, nelle Marche ed in Lombardia. Successivamente, aderirono al programma altre regioni, quali il Lazio, l'Emilia Romagna, il Veneto, sulla base di iniziative autonome. Nel 1992 è stata emanata una legge nazionale¹ per lo screening neonatale della fenilchetonuria, nell'ambito della legge-quadro per l'assistenza, l'integrazione sociale ed i diritti delle persone handicappate. In tale legge veniva sottolineata l'obbligatorietà all'esecuzione dello screening neonatale per l'individuazione precoce dei soggetti affetti da fenilchetonuria.

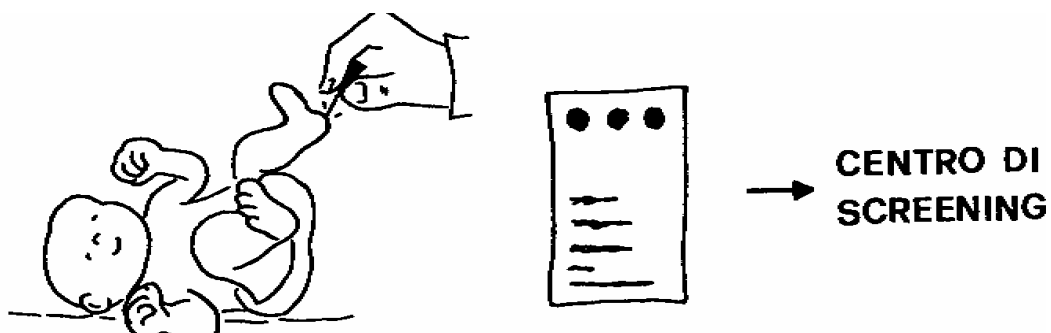
In Sicilia il programma di screening è stato attuato agli inizi degli anni '80 sulla base di iniziative autonome dei medici di taluni punti-nascita, che inviavano i cartoncini per il test di Guthrie o presso il Centro di Screening della regione Lazio, oppure presso la Clinica Pediatrica del Policlinico di Catania dove veniva eseguito lo screening neonatale per chi ne faceva richiesta.

In seguito alla legge nazionale sopra menzionata, che ha reso obbligatorio lo screening neonatale su tutto il territorio italiano, anche in Sicilia, nell'anno 1992 è

¹ Legge 5 febbraio 1992 n. 104 Gazzetta Ufficiale 17 febbraio 1992 n. 39

iniziato, ufficialmente, il programma regionale per l'obbligatorietà dello screening neonatale per la fenilchetonuria.

Nel 1992 sono stati creati in Sicilia quattro Centri di screening, localizzati a Palermo, Caltanissetta, Catania e Messina, che hanno il compito di raccogliere i cartoncini di carta-bibula contenenti il sangue dei neonati siciliani provenienti dai vari punti-nascita del territorio, che hanno l'obbligo di eseguire il prelievo ai neonati.



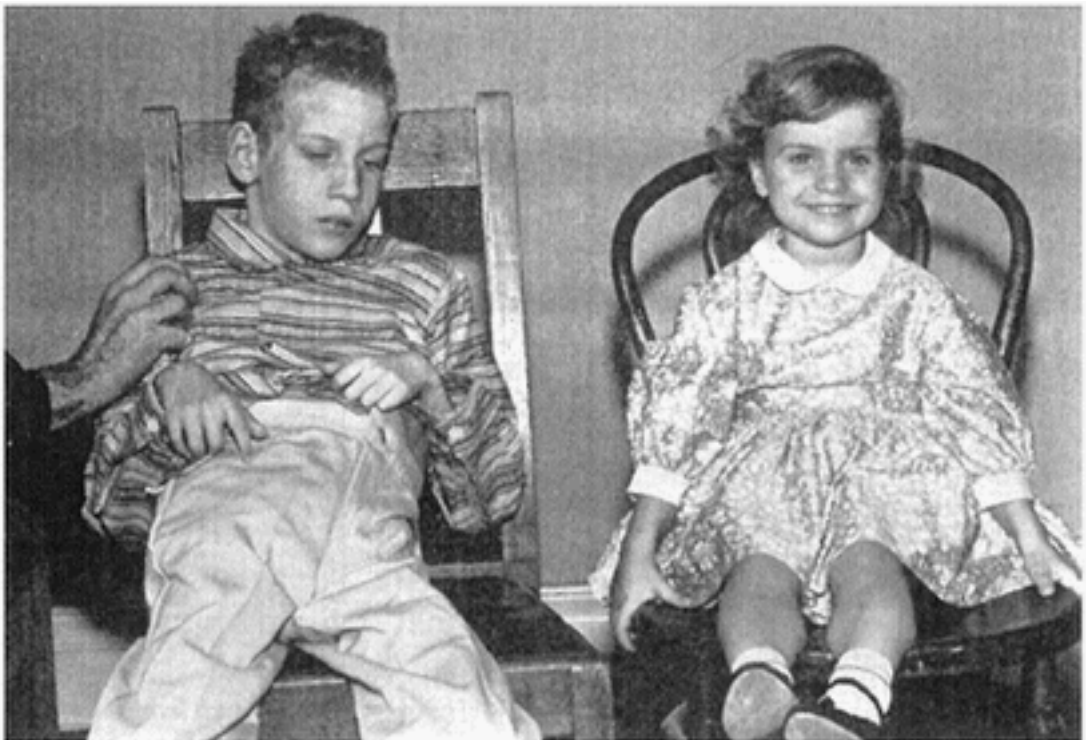
Intorno al terzo giorno di vita, per obbligo di legge, a tutti i neonati siciliani vengono prelevate, dal tallone, poche gocce di sangue che vengono raccolte sugli appositi cartoncini di carta-bibula e lasciate essiccare. I cartoncini raccolti nelle maternità vengono successivamente spediti al Centro di screening di competenza che esegue la determinazione della fenilalanina.

Il Centro screening di Palermo raccoglie i cartoncini provenienti dai punti-nascita della provincia di Palermo e Trapani; il Centro screening di Caltanissetta raccoglie i cartoncini delle province di Agrigento, Enna e Caltanissetta; il Centro screening di Catania raccoglie i cartoncini delle province di Ragusa, Siracusa e Catania; il Centro screening di Messina raccoglie i cartoncini provenienti dalla stessa provincia e dei neonati nelle isole Eolie.

Il Centro di screening analizza il sangue imbibito sui cartoncini per la determinazione del tasso ematico della fenilalanina. Quando nel sangue viene riscontrato una concentrazione di fenilalanina superiore ai valori normali (2 mg/dl), il responsabile del Centro di screening ha l'obbligo di comunicare alla famiglia la

'positività' del test nel neonato ed indirizzarla verso un Centro di riferimento specializzato per la cura della fenilchetonuria.

Il programma di screening neonatale ha permesso così di individuare, anche nel nostro territorio, un gran numero di neonati siciliani affetti da fenilchetonuria che altrimenti sarebbero andati incontro ad handicap cerebrale grave ed irreversibile.



Confronto tra un soggetto affetto da fenilchetonuria non trattata e uno trattato. Il ragazzo di 11 anni è gravemente ritardato, mentre

sua sorella, di 2 anni e mezzo, presenta uno sviluppo normale, perchè diagnosticata alla nascita e subito trattata con la dieta.

2.5. LA TERAPIA DIETETICA

Dal 1953 la terapia dietetica 'inventata' in quell'anno da Bickel rappresenta ancora oggi il fondamentale approccio terapeutico alla Fenilchetonuria.

Lo scopo della dietoterapia è quello di ridurre i livelli plasmatici di fenilalanina e mantenerli entro limiti tali (2 - 6 mg/dl) da consentire al soggetto affetto un normale sviluppo del sistema nervoso.

Principi di dietoterapia

La terapia dietetica per la cura della fenilchetonuria si attua escludendo dall'alimentazione quotidiana tutti gli alimenti a più alto contenuto proteico, come, ad esempio, quelli di origine animale, quali carne, uova, pesce, insaccati e latticini, come pure i legumi ed i farinacei preparati con farina normale di tipo 0 o 00 o con farina integrale o di soia.

L'esclusione rigorosa dalla dieta quotidiana di tali alimenti rende indispensabile l'integrazione giornaliera di miscele di aminoacidi assolutamente privi di fenilalanina che servono a coprire il fabbisogno proteico ed assicurare la normale crescita del bambino.

I farinacei tradizionali devono essere necessariamente sostituiti con farinacei preparati con farina a basso contenuto proteico e quindi, poveri in fenilalanina.

Nella dieta della fenilchetonuria bisogna dunque utilizzare pane, pasta, farina, brioches, biscotti e quant'altro esiste in commercio di tipo 'aproteico', in sostituzione di quelli tradizionali.

Le verdure e la frutta possono essere somministrate in quantità libera, ad eccezione delle patate, dei cavolfiori e degli spinaci che necessitano un apporto 'controllato'.

ALIMENTI PROIBITI

- carne, pesce, uova;
- salumi, prosciutto, mortadella e tutti i tipi di affettati;
- formaggi;
- pasta, riso, pane, biscotti, brioches e dolci del commercio preparati con farina normale (tipo 0, tipo 00, di soia o integrale);
- cacao e cioccolato di qualsiasi tipo;
- legumi freschi e secchi;

- aspartame (dolcificante sintetico a basso contenuto calorico, utilizzato in alimenti ipocalorici tipo “linea *light*”);

- “dadi” di carne per brodo;
- pesce in scatola (tonno, sardine, acciughe etc.) o carne in scatola.

ALIMENTI DA ASSUMERE IN MANIERA ‘CONTROLLATA’

- latte;
- formaggini e ricotta;
- alcuni vegetali, quali patate, spinaci e cavolfiori;
- frutta secca: mandorle, noci, noccioline, pistacchio;
- taluni prodotti del commercio, come ad esempio la maionese o il ketch up, oppure alcuni gelati, in cui il contenuto di proteine riportato sulla confezione sia inferiore a 2 gr.%.

ALIMENTI LIBERI

- verdure e la maggior parte dei vegetale
- frutta fresca;
- tutti i tipi di olio, burro e margarina vegetali;
- zucchero e miele (che non contenga pappa reale);
- caramelle alla frutta;
- condimenti: sale, pepe, aceto, spezie: timo, alloro, cannella, etc.
- alcune farine: maizena e tapioca;
- sciroppi di frutta purché privi di Aspartame;
- bevande: limonata, aranciata, coca-cola, etc. purché prive di Aspartame;
- tutti i prodotti aproteici del commercio, quali pane, pasta, pancarrè, fette biscottate, biscotti, brioches, etc..

La dieta deve inoltre essere integrata con un adeguato apporto di vitamine che devono essere somministrate quotidianamente allo scopo di prevenire eventuali quadri carenziali.

Allo scopo di verificare l'efficacia della terapia dietetica il bambino fenilchetonurico dovrà essere sottoposto a controlli periodici sia del livello plasmatico di fenilalanina che a visite cliniche.

Fino a qualche tempo addietro si era tutti concordi nell'affermare che fosse sufficiente protrarre il trattamento dietetico fino all'adolescenza, epoca in cui il sistema nervoso centrale raggiunge una completa maturazione risultando così più resistente al danno causato dagli alti livelli di fenilalanina nel sangue.

Oggi, invece, vi è un dibattito internazionale che vede contrapposte due scuole di pensiero che si pongono diversamente nei confronti del problema 'sospensione dieta'. Infatti, un numero sempre maggiore di studiosi è concorde nell'asserire che la dieta dovrebbe essere mantenuta per tutta la vita. Alla base di questa affermazione vi sono le segnalazioni di taluni casi di soggetti fenilchetonurici adulti, che avevano sospeso il trattamento dietetico nell'età adolescenziale e che, dopo qualche anno di dieta libera, avevano presentato episodi di cefalea, tremori intenzionali, psicosi e difficoltà nella concentrazione. La segnalazione di questi casi ed i risultati degli studi neurofisiologici condotti su alcuni gruppi di soggetti fenilchetonurici adulti a dieta libera ha indotto a ritenere che sarebbe meglio proseguire la dieta oltre la pubertà, possibilmente per tutta la vita.

L'altra scuola di pensiero sostiene invece che la dieta può essere sospesa intorno al diciottesimo anno di vita, con le dovute cautele inerenti ogni singolo caso. Personalmente ritengo che non sia sufficiente il raggiungimento del diciottesimo anno di età per liberalizzare definitivamente la dieta. Vi sono tanti fattori che vanno valutati, quali lo stato generale, clinico e psicologico del soggetto, l'aderenza alla dieta durante tutta la durata del trattamento.

Ai ragazzi che sospendono la dieta si raccomanda di restare in contatto con i medici che li hanno seguiti e di non esitare a riferire qualunque sintomo, dubbio o perplessità.

Oggi si è universalmente concordi nell'affermare che nei casi in cui la diagnosi di fenilchetonuria sia stata posta tardivamente, dunque per sintomi e non da screening neonatale, la dieta non debba essere mai sospesa.

Problemi peculiari presentano, inoltre, le ragazze affette da fenilchetonuria.

Infatti, alla fine degli anni settanta, negli Stati Uniti ci si trovò di fronte alla prima generazione di donne fenilchetonuriche che erano state diagnosticate alla nascita alle quali era stato consigliato di interrompere la dieta avendo oramai raggiunto una certa età con uno sviluppo neurologico normale.

Le donne, oramai a dieta completamente libera, mantenevano elevati livelli ematici di fenilalaninemia, che tuttavia si ritenevano non più nocivi.

Si verificò purtroppo una situazione allarmante: in occasione di gravidanza queste donne presentavano abortività recidivante oppure davano alla luce neonati con malformazioni congenite caratteristiche, basso peso alla nascita, microcefalia e ritardo mentale.

L'insieme di questa patologia è stato definito quale "Sindrome da fenilchetonuria materna", poiché da diversi studi collaborativi è stato dimostrato che il danno al prodotto del concepimento è da correlare all'alto livello di fenilalanina materna, rivelatosi vero agente teratogeno su feto in via di sviluppo.

Dagli studi effettuati è stato inoltre dimostrato che la dietoterapia, iniziata a gravidanza già avviata, non modifica il rischio dell'embriofetopatia.

Viceversa, per prevenire la Sindrome da fenilchetonuria materna, la dieta va iniziata in periodo preconcezionale. La difficoltà di reintrodurre una dieta ristretta dopo la sua liberalizzazione fa ritenere preferibile per la donna non interrompere la dietoterapia fino al termine dell'età fertile.

2.6. LA FENILCHETONURIA: NUOVE PROSPETTIVE DI TRATTAMENTO

L'obiettivo attuale della ricerca scientifica è quello di mettere a punto trattamenti terapeutici alternativi alla dieta per la cura della fenilchetonuria.

La terapia genica, e cioè la sostituzione (attraverso sofisticate tecniche di ingegneria genetica) di quella porzione di DNA 'mutato' con una in grado di produrre l'enzima funzionante, è ancora una strada non percorribile nel caso della fenilchetonuria.

I nuovi approcci terapeutici per la fenilchetonuria si sono pertanto rivolti verso l'utilizzo della terapia enzimatica sostitutiva, cioè la somministrazione periodica dell'enzima deficitario, sulla base dei buoni risultati che si sono ottenuti per la cura di altre malattie metaboliche.

Purtroppo, il fallimento della ricerca portata avanti dal dr. A. Gamez e collaboratori, che nel 2004 per primi hanno tentato la terapia enzimatica sostitutiva dell'enzima fenilalanina idrossilasi ha, almeno per ora, rallentato la possibilità di riuscita di questa via terapeutica alternativa.

Una nuova potenziale possibilità terapeutica per la fenilchetonuria, attualmente in fase di studio, consiste nella realizzazione di un enzima (Phenylalanine Ammonia Liase = PAL) in grado di operare la trasformazione della fenilalanina in un composto non tossico: l'acido cinnamico. Quest'ultimo, legandosi ad un aminoacido presente nel sangue, la glicina, viene convertito in acido ippurico ed eliminato con le urine.

Questa particolare azione dell'enzima PAL, largamente rappresentato nel regno vegetale ed in particolare nei funghi, fu scoperta a metà degli anni Settanta da un gruppo di ricercatori britannici che da allora si sono impegnati nell'applicazione di tale enzima come terapia alternativa alla dieta nella fenilchetonuria. Essi hanno infatti dimostrato che in un paziente fenilchetonurico non in dietoterapia i livelli plasmatici di fenilalanina si riducevano del 22% dopo l'assunzione orale per 12 giorni consecutivi di tavolette di PAL. Il problema fondamentale era legato al fatto che il PAL, dopo l'ingestione, viene inattivato molto rapidamente nell'intestino.

Nel 1995 il dr. C. Sarkissian e collaboratori hanno descritto un metodo efficace e sicuro per la produzione di una forma di PAL "più resistente", dimostrandone l'efficacia in modelli animali e, nel 2005 gli stessi ricercatori hanno dimostrato come questa nuova forma di PAL, somministrato per via orale, fosse in grado di ridurre la concentrazione plasmatica di fenilalanina, in topi affetti da fenilchetonuria, del 31% dopo 1 ora e del 44% dopo 2 ore.

Tuttavia, sebbene resti allettante la possibilità di somministrare il PAL per via orale, è stata successivamente considerata l'ipotesi di ottenere migliori risultati

attraverso una diversa modalità di somministrazione di tale enzima, ovvero la via parenterale sottocutanea.

Nel 2005, gli stessi ricercatori hanno dimostrato come la somministrazione sottocutanea di PAL determini una maggiore riduzione della concentrazione plasmatica di fenilalanina.

Tuttavia, tale forma di somministrazione non dava inizialmente risultati ottimali, a causa delle notevoli proprietà immunogene del PAL tali da far sì che l'organismo sviluppasse notevoli quantità di anticorpi contro tale molecola.

Nel 2006 è stata quindi sperimentata dagli stessi ricercatori, tramite tecniche di ingegneria molecolare, una variante di tale enzima: il PEG-PAL (polietilenglicosilazione del PAL) in grado di possedere una minore attività immunogena. Test sperimentali effettuati sugli animali hanno dimostrato come questo enzima PEG-PAL, somministrato per via sottocutanea per 12 settimane tramite iniezioni mono-settimanali, permetta di ridurre i livelli plasmatici di fenilalanina al di sotto dei valori di normalità.

Nel 2007 la casa farmaceutica americana BioMarine ha annunciato di aver presentato alla FDA (Food & Drug Administration) la richiesta per la sperimentazione clinica sull'uomo dell'enzima PEG-PAL.

L'impiego del cofattore enzimatico BH4 come terapia alternativa alla dieta nella fenilchetonuria

Nei primi anni del 2000 l'attenzione degli studiosi si è spostata sulla possibilità di impiego del cofattore enzimatico BH4 come alternativa terapeutica alla dieta per la cura della Fenilchetonuria.

Alla fine degli anni Novanta, infatti, sono stati descritti per la prima volta in letteratura tre pazienti giapponesi affetti da Fenilchetonuria che avevano mostrato una diminuzione significativa dei livelli plasmatici di fenilalanina dopo l'assunzione orale di BH4 alla dose di 20 mg/Kg. Ciò aveva consentito la liberalizzazione della dieta dopo l'attuazione del trattamento farmacologico con BH4. In seguito a tale segnalazione numerosi altri Centri europei ed americani provarono ad utilizzare la

BH4 per via orale nei pazienti fenilchetonurici. Nei primi anni del 2000 vennero organizzati Studi Collaborativi sia negli Stati Uniti che in Europa ed i risultati ottenuti dimostrarono che la maggior parte dei soggetti fenilchetonurici 'responsivi' alla BH4 erano affetti da varianti definite *mild* o lievi di Fenilchetonuria. Il razionale scientifico della risposta positiva alla somministrazione della BH4 era da ricondurre alla condizione genetica del paziente, caratterizzata da mutazioni del gene PAH che danno origine ad un enzima la cui attività enzimatica viene potenziata in presenza del suo coenzima BH4 ad alte dosi.

Nella **Fig. 4** è riportata la struttura dell'enzima PAH e nella **tabella 1** sono riportate le mutazioni genetiche correlate alla responsività al Cuvan.

FIG.4 STRUTTURA PAH

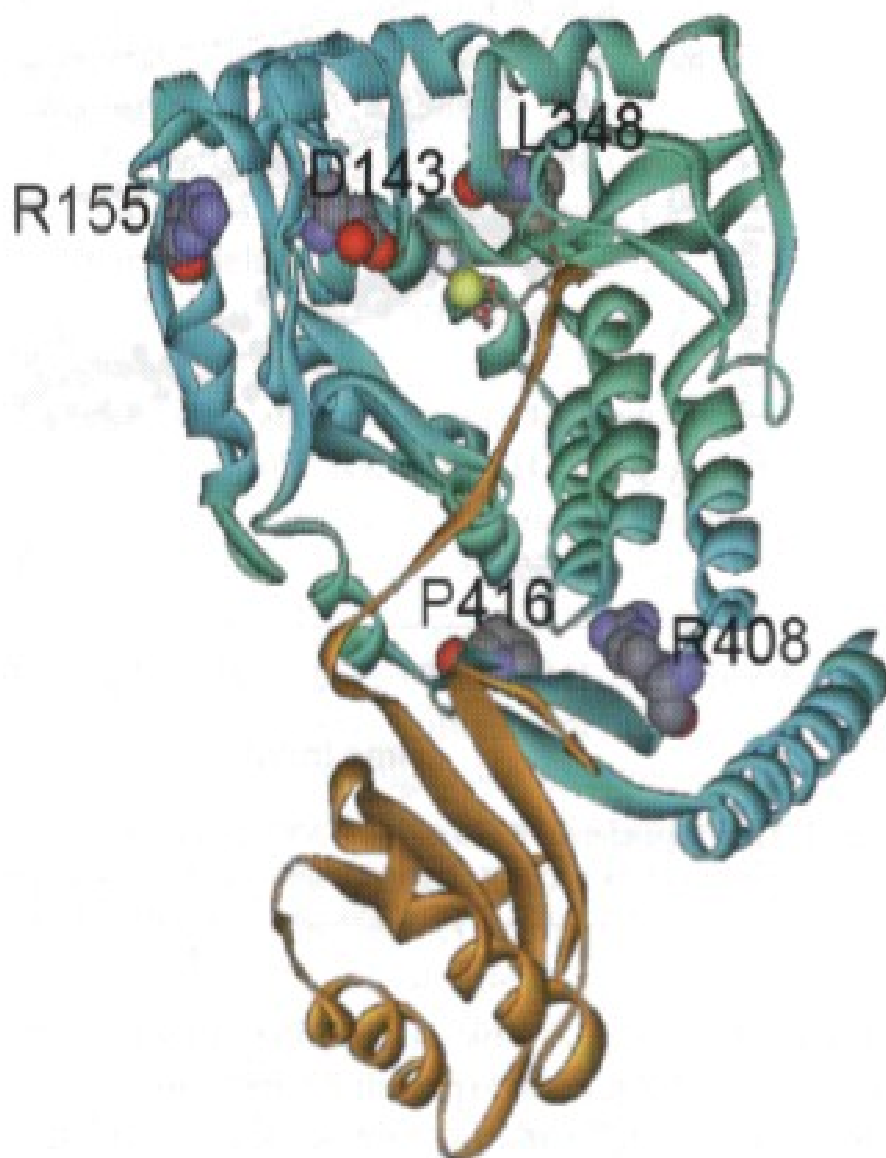


Tabella 1 Mutazioni correlate alla responsività al Kuvan

Allele 1	Allele 2	BH ₄ responsive ^a	Decrease in blood Phe from baseline (%)	Domain
p.R158Q	p.A403V	Full	≥30	Catalytic/ Catalytic
p.R158Q	p.E280K	No	≤9	Catalytic/Non-responsive
p.R158Q	p.E390G	Full	≥30	Catalytic/ Catalytic
p.R158Q	p.IVS12+1g>a	No	≤9	Catalytic/Non-responsive
p.R158Q	p.IVS4+5g>t	Full	≥30	Catalytic/Unclear
p.R158Q	p.L48S	Full	≥30	Catalytic/ Regulatory
p.R261Q	p.R158Q	Full	≥30	Catalytic /Catalytic
p.L48S	p.R158Q	Full	≥30	Regulatory /Catalytic
p.I65T	p.R158Q	No	≤9	Regulatory /Catalytic
p.R158Q	p.R261Q	Full	≥30	Catalytic/ Catalytic
p.R158Q	p.R261X	No	≤9	Catalytic/Non-responsive ^b
p.R158Q	p.R408W	No	≤9	Catalytic/Non-responsive ^b
R158Q	p.T193L194fsdelCT	No	≤9	Catalytic/Unclear
p.R158Q	p.T193L194fsdelCT	No	≤9	Catalytic/Unclear
p.R158Q	p.W187R	Full	≥30	Catalytic/Unclear
p.R68S	p.I65T	Partial	10–29	Regulatory/Regulatory
p.R68S	p.I65T	Partial	10–29	Regulatory/Regulatory
p.L48S	p.I65T	No	≤9	Regulatory/Regulatory
p.I65T	p.R261Q	Partial	10–29	Regulatory /Catalytic
p.I65T	p.V388M	Partial	10–29	Regulatory /Catalytic
p.R68S	p.I65T	Partial	10–29	Regulatory/Regulatory
p.F39L	p.P122Q	No	≤9	Regulatory/Regulatory

Dal momento che la BH4 non esisteva come farmaco si è reso indispensabile avviare uno studio clinico mondiale allo scopo di sperimentare e valutare l'efficacia e la sicurezza della molecola utilizzata.

La casa farmaceutica americana Biomarin ha prodotto tale molecola con il nome di Phenoptin (idrocloreuro di sapropterina) e l'ha distribuito ai Centri che hanno preso parte alla sperimentazione.

Phenoptin™ è un prodotto sperimentale che non è stato approvato per il trattamento della PKU dall'ente statunitense Food and Drug Administration (FDA) né da altre autorità regolatorie. Per farlo approvare, si è reso necessario dimostrarne sperimentalmente l'efficacia e la sicurezza.

Nella seconda parte di questa tesi riportiamo i risultati dello studio pilota condotto negli anni 2005-2009 che ha coinvolto anche i pazienti fenilchetonurici seguiti presso la Clinica Pediatrica di Catania.

PARTE II

LA SPERIMENTAZIONE CLINICA

STUDIO ESTESO POLICENTRICO SU PHENOPTIN™ (IDROCLORURO DI SAPROPTERINA) IN SOGGETTI AFFETTI DA FENILCHETONURIA

Premessa e scopo della sperimentazione

La sperimentazione clinica con Phenoptin™ (idrocloruro di sapropterina) in soggetti affetti da Fenilchetonuria si è resa necessaria per dimostrare la sicurezza e l'efficacia di tale molecola per la sua approvazione da parte della Food and Drug Administration (FDA) quale trattamento alternativo alla dieta per la cura della Fenilchetonuria.

Gli obiettivi dello studio, riassunti nei punti che seguono, erano:

- 1) verificare se il trattamento con Phenoptin™ fosse in grado o meno di metabolizzare la fenilalanina ematica;
- 2) valutare, mediante studio randomizzato in doppio cieco controllato verso placebo, l'efficacia e la sicurezza di Phenoptin™ ;
- 3) valutare l'efficacia di Phenoptin™ al dosaggio di 5, 10 oppure 20 mg/Kg/die;
- 4) valutare la sicurezza del trattamento a lungo termine con Phenoptin™ .

Pazienti e Metodi

Sono stati coinvolti nella sperimentazione clinica 35 Centri di tutto il mondo che si occupano della presa in carico dei pazienti affetti da Fenilchetonuria. Per l'Italia, hanno partecipato alla sperimentazione la Clinica Pediatrica dell'Ospedale S.Paolo dell'Università di Milano e la Clinica Pediatrica del Policlinico dell'Università di Catania.

A tal fine è stato stipulato un regolare contratto tra la casa farmaceutica Biomarin ed il Policlinico di Catania.

Sono stati inclusi nella prima fase della sperimentazione un numero complessivo di 489 pazienti che avevano sospeso la dieta o che erano poco aderenti alle prescrizioni dietetiche e che pertanto presentavano un livello di fenilalanina plasmatica superiore a 600 $\mu\text{mol/L}$ (10mg/dl).

La sperimentazione con Phenoptin™ è stata articolata nella seguenti fasi o studi clinici:

1) **Studio PKU-001:** rappresentava la prima fase della sperimentazione clinica ed aveva lo scopo di verificare se il trattamento con Phenoptin™ al dosaggio di 10 mg/Kg/die fosse in grado o meno di metabolizzare la fenilalanina plasmatica. I pazienti che presentavano una riduzione significativa dei livelli iniziali di fenilalanina in seguito alla somministrazione di Phenoptin™ venivano inclusi nello studio successivo PKU-003.

2) **Studio PKU-003:** è lo studio randomizzato in doppio cieco controllato verso placebo, per valutare l'efficacia e la sicurezza di Phenoptin™. Sono stati inclusi in questo studio tutti i pazienti 'responsivi' al trattamento con Phenoptin™ che avevano partecipato allo studio PKU-001.

3) **Studio PKU-004:** ulteriore studio per valutare l'efficacia di Phenoptin™ al dosaggio di 5, 10 oppure 20 mg/Kg/die. Sono stati inclusi in questo studio tutti i soggetti che avevano partecipato allo studio PKU-003. Hanno aderito a questo studio anche altri centri che non avevano partecipato agli studi precedenti. Tra questi, per l'Italia, ha partecipato il Dipartimento di Pediatria dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II".

4) **Studio PKU-008:** studio eseguito allo scopo di valutare la sicurezza del trattamento a lungo termine con Phenoptin™ nei soggetti che avevano partecipato agli studi clinici di fase PKU-001 e PKU-003.

Studio PKU-001

Lo studio PKU-001 si proponeva di verificare l'efficacia del trattamento con Phenoptin™ ad un dosaggio di 10 mg/Kg/die.

Criteri di inclusione nello studio PKU-001: per essere incluso nello studio PKU-001 il soggetto doveva essere affetto da Fenilchetonuria, avere un'età superiore agli 8 anni, avere un livello di fenilalanina di almeno 600 µmol/L (10mg/dl).

Il medico responsabile della sperimentazione doveva valutare che non vi fossero altre condizioni mediche o trattamenti farmacologici concomitanti che avrebbero potuto rendere lo studio poco sicuro. Nel caso della partecipazione allo studio di minori di anni 18, veniva richiesto il consenso di un genitore o tutore. I pazienti maggiorenni dovevano firmare ugualmente un consenso informato.

Il candidato veniva dunque sottoposto ad una visita medica iniziale per il controllo delle condizioni fisiche e del peso. Venivano pertanto eseguiti esami di laboratorio per verificare il livello iniziale di fenilalanina e se le condizioni di salute erano tali da permettere al soggetto di partecipare allo studio.

Le candidate in età fertile dovevano fornire un campione di urina per effettuare un test di gravidanza. Qualora il test fosse risultato positivo la candidata non poteva essere inclusa nello studio. Una volta completati i test necessari di selezione, i candidati venivano informati dell'inclusione o meno nello studio.

Tutti i dati derivanti dalle visite cliniche, i risultati degli esami di laboratorio e le valutazioni dei livelli di fenilalanina nel sangue venivano registrati sulle schede di raccolta dati (CFR) del paziente. Le schede CFR venivano periodicamente inviate al centro di coordinamento dello studio che provvedeva alla raccolta, alla computerizzazione e alla elaborazione statistica dei dati.

Criteri di esclusione dallo studio PKU-001: le persone non idonee a partecipare a questo studio comprendevano quanti soddisfacevano uno qualsiasi dei seguenti criteri:

- Impressione di inaffidabilità o mancata disponibilità a partecipare allo studio o, nel caso dei minori di anni 18, affidamento a genitori o tutori legali che diano l'impressione di essere inaffidabili o non disponibili.
- Uso di qualsiasi prodotto investigativo diverso da Phenoptin™ nel corso dei 30 giorni precedenti lo screening, o previsione d'uso di un qualsiasi agente investigativo prima del completamento di tutte le valutazioni programmate ai fini di questo studio.
- Esito positivo del test di gravidanza condotto sull'urina all'atto dello screening (solo donne non sterili di età fertile), gravidanza già in corso o allattamento al seno o pianificazione della gravidanza propria o della partner durante lo studio.
- Le pazienti di età fertile dovevano infatti utilizzare un metodo contraccettivo efficace, come stabilito dall'investigatore principale, ed essere disposte a continuare ad usare misure accettabili per il controllo delle nascite.
- Condizione o affezione concomitante tale da interferire con la partecipazione o la sicurezza dello studio (ad es., epilessia, asma dipendente dall'assunzione per via orale di steroidi o altre condizioni che richiedano l'assunzione orale o parenterale di corticosteroidi, oppure diabete dipendente dall'assunzione di insulina).
- Qualsiasi condizione che, a parere dell'investigatore principale, avrebbe potuto esporre il soggetto a rischi elevati in caso di conformità al trattamento e/o completamento dello studio.
- ALT >2 volte il limite normale superiore (ovvero di grado 1 o superiore in base ai criteri di tossicità dell'OMS) all'atto dello screening.
- Grave malattia neuropsichiatrica (ad es., depressione grave) non soggetta a controllo medico corrente.
- Antecedenti di trapianto di organi.

- Necessità di trattamento concomitante con qualsiasi altro farmaco di cui si conosca l'attività inibente la sintesi del folato (ad es., metotrexato).
- Uso concomitante di levodopa.

Pazienti e periodo di trattamento

Sono stati inclusi nello studio PKU-001 un numero complessivo di 498 soggetti affetti da fenilchetonuria che presentavano un livello plasmatico di fenilalanina superiore a 12 mg/dl. Tra questi, hanno partecipato allo studio PKU-001 20 pazienti siciliani affetti da fenilchetonuria, di età compresa tra i 12 ed i 18 anni, 16 maschi e 4 femmine, seguiti presso la Clinica Pediatrica del Policlinico dell'Università di Catania sin dal periodo della diagnosi di fenilchetonuria e cioè durante il periodo neonatale.

Lo studio PKU-001 ha avuto una durata di 8 giorni per ciascun paziente. Esso prevedeva un primo incontro, al giorno 0, durante il quale venivano consegnate le compresse che il paziente doveva portare a casa, per assumerle, a partire dall'indomani (giorno 1) al mattino prima della colazione, sciolte o in ¼ di litro d'acqua, oppure in succo d'arancia.

All'ottavo giorno di trattamento il paziente veniva convocato per eseguire:

- Visita medica: il paziente veniva sottoposto alla visita medica volta ad accertare lo stato di salute complessivo. Venivano inoltre valutati i segni vitali quali la frequenza cardiaca, la frequenza respiratoria, la pressione arteriosa, la temperatura ed il peso corporeo.
- Esami del sangue: veniva prelevato un campione di sangue sia per misurare il livello di fenilalanina che per eseguire comuni analisi di laboratorio. Il prelievo veniva effettuato nel periodo da 3 a 5 ore dopo l'assunzione del farmaco Phenoptin™.

- Esami delle urine: venivano raccolti anche i campioni di urina allo scopo di verificare la normalità dei parametri urinari.

- Test di gravidanza: le partecipanti in età fertile venivano sottoposte ad un'analisi delle urine per escludere un'eventuale gravidanza. Se il risultato veniva positivo o dubbio si sarebbe dovuto passare ad un test di gravidanza su siero. Se il test veniva positivo la paziente doveva essere esclusa dallo studio. Le pazienti in età fertile non incinte per poter essere coinvolte nel proseguimento dello studio (PKU-003) dovevano astenersi dai rapporti sessuali durante lo studio o usare un metodo accettabile di contraccezione.

- Valutazione di eventuali eventi avversi: veniva domandato al paziente o ai familiari se erano stati notati effetti sfavorevoli o problemi medici. Qualora si fosse verificato un evento avverso il centro di coordinamento dello studio dava comunicazione scritta a tutti gli altri centri partecipanti allo studio, nonché ai relativi comitati etici.

- Valutazione eventuale trattamento concomitante con altri farmaci: veniva chiesto al paziente di elencare gli eventuali altri medicinali in corso, quali vitamine, prodotti naturali di erboristeria o altri farmaci eventualmente utilizzati.

- Gestione del farmaco Phenoptin™: i pazienti coinvolti nello studio avevano l'obbligo di riportare in Clinica i flaconi di farmaco utilizzato, compresi quelli vuoti.

Risultati dello studio PKU-001: dopo 8 giorni di trattamento con Phenoptin™, in 96 pazienti su 498 si è avuta una diminuzione dei livelli plasmatici di fenilalanina del 30%.

Questi 96 pazienti sono stati dunque considerati 'responsivi' al trattamento con Phenoptin™ . Tra questi vi erano anche 3 pazienti siciliani seguiti presso la Clinica Pediatrica del Policlinico di Catania, coinvolti nello studio. Infatti, dei 20 pazienti siciliani inseriti nello studio PKU-001, 3 sono risultati 'responsivi' al trattamento con Phenoptin™ mostrando una riduzione significativa dei livelli iniziali di fenilalanina. Tutti e 3 i soggetti, 2 di sesso maschile e 1 di sesso femminile, stati inseriti nello studio clinico successivo PKU-003.

Studio PKU-003

Lo studio PKU-003 o studio di fase 3, era uno studio randomizzato, in doppio cieco, controllato verso placebo, di valutazione della sicurezza e dell'efficacia di Phenoptin™ in soggetti affetti da fenilchetonuria con elevati livelli di fenilalanina, che avevano partecipato allo studio PKU-001.

Ciò significa che metà dei partecipanti avrebbe ricevuto le compresse del farmaco in studio e l'altra metà avrebbe ricevuto compresse di identico aspetto ma che non contenevano alcun farmaco. Le compresse senza farmaco sono dette placebo ed avevano lo stesso aspetto delle compresse di Phenoptin™ ma in realtà non contenevano il principio attivo. L'assegnazione delle compresse è stata decisa casualmente dai responsabili del centro di coordinamento dello studio.

Nel caso della partecipazione allo studio di minori di anni 18, veniva richiesto il consenso di un genitore o tutore. I pazienti maggiorenni dovevano firmare ugualmente un consenso informato.

Tutti i dati derivanti dalle visite cliniche, i risultati degli esami di laboratorio e le valutazioni dei livelli di fenilalanina nel sangue venivano registrati sulle schede di raccolta dati (CFR) del paziente. Le schede CFR venivano periodicamente inviate al centro di coordinamento dello studio che provvedeva alla raccolta, alla computerizzazione e alla elaborazione statistica dei dati.

Nel caso della partecipazione allo studio di minori di anni 18, veniva richiesto il consenso di un genitore o tutore. I pazienti maggiorenni dovevano firmare ugualmente un consenso informato.

Qualora si fosse verificato un evento avverso il centro di coordinamento dello studio dava comunicazione scritta a tutti gli altri centri partecipanti allo studio, nonché ai relativi comitati etici.

Criteri di inclusione nello studio PKU-003: sono stati inclusi nello studio PKU-003 gli individui affetti da fenilchetonuria che avevano partecipato allo studio precedente di sperimentazione clinica PKU-001 che avrebbero soddisfatto tutti i seguenti criteri:

- disponibilità e capacità di fornire un consenso informato scritto o, in caso di minori di anni 18, di fornire un assenso scritto (se richiesto) ed un consenso informato scritto firmato da un genitore o tutore legale, una volta spiegata la natura dello studio e prima di cominciare qualsiasi procedura associata alla ricerca.
- Test negativo di gravidanza all'atto dello screening (per le sole donne di età fertile).
- Disponibilità e capacità di conformarsi a tutte le procedure dello studio.

Criteri di esclusione dallo studio PKU-003: le persone non idonee a partecipare a questo studio comprendevano quanti soddisfavano uno qualsiasi dei seguenti criteri:

- Impressione di inaffidabilità o mancata disponibilità a partecipare allo studio o, nel caso dei minori di anni 18, affidamento a genitori o tutori legali che diano l'impressione di essere inaffidabili o non disponibili.
- Esito positivo del test di gravidanza condotto sull'urina all'atto dello screening (solo donne non sterili di età fertile), gravidanza già in corso o

allattamento al seno o pianificazione della gravidanza propria o della partner durante lo studio.

- Le pazienti di età fertile dovevano infatti utilizzare un metodo contraccettivo efficace, come stabilito dall'investigatore principale, ed essere disposte a continuare ad usare misure accettabili per il controllo delle nascite.

- Condizione o affezione concomitante tale da interferire con la partecipazione o la sicurezza dello studio (ad es., epilessia, asma dipendente dall'assunzione per via orale di steroidi o altre condizioni che richiedano l'assunzione orale o parenterale di corticosteroidi, oppure diabete dipendente dall'assunzione di insulina)

- Qualsiasi condizione che, a parere dell'investigatore principale, avrebbe potuto esporre il soggetto a rischi elevati in caso di conformità al trattamento e/o completamento dello studio.

- ALT >2 volte il limite normale superiore (ovvero di grado 1 o superiore in base ai criteri di tossicità dell'OMS) all'atto dello screening.

- Uso concomitante di levodopa.

PAZIENTI E PERIODO DI TRATTAMENTO

I 96 pazienti che avevano partecipato allo studio PKU-001, risultati 'responsivi' al trattamento con Phenoptin™ e che rispondevano ai criteri richiesti per l'inclusione nello studio PKU-003, sono stati divisi in due gruppi: il primo comprendeva 41 pazienti trattati con Phenoptin™ mentre il secondo gruppo comprendeva 45 pazienti trattati con un placebo. Anche i 3 pazienti siciliani che avevano avuto una buona risposta al trattamento con Phenoptin™ durante lo studio PKU-001 sono stati inseriti in questo studio. Non è stato possibile sapere chi dei 3 pazienti siciliani è stato inserito nel gruppo placebo.

Lo studio clinico PKU-003 per entrambi i gruppi è durato 14 settimane.

Tutti i dati derivanti dalle visite cliniche, i risultati degli esami di laboratorio e le valutazioni dei livelli di fenilalanina nel sangue venivano registrati sulle schede di

raccolta dati (CFR) del paziente. Le schede CFR venivano periodicamente inviate al centro di coordinamento dello studio che provvedeva alla raccolta, alla computerizzazione e alla elaborazione statistica dei dati.

Lo studio PKU-003 per ciascun paziente è durato 14 settimane e in quel periodo al paziente è stato richiesto di recarsi in clinica 7 volte. Durante la prima visita veniva eseguito un prelievo di sangue e la raccolta delle urine per valutare lo stato di salute e controllare il livello ematico della fenilalanina. Le ragazze in età fertile venivano sottoposte ad analisi per escludere un'eventuale gravidanza. Alla seconda visita venivano consegnate le pillole da portare a casa, da assumere al mattino, prima di far colazione, sciolte o in $\frac{1}{4}$ di litro d'acqua, oppure di succo d'arancia.

In occasione di ciascuna visita prevista durante il periodo di trattamento dalla visita 2 alla visita 6 venivano eseguite le seguenti valutazioni ed analisi: visita medica, volta ad accertare lo stato di salute complessivo, durante la quale venivano valutati i segni vitali quali la frequenza cardiaca, la frequenza respiratoria, la pressione arteriosa, la temperatura ed il peso corporeo. Veniva domandato al paziente o ai familiari se erano stati notati effetti sfavorevoli o problemi medici rispetto all'ultima visita.

Alla visita della settimana 6 veniva prelevato un campione di sangue, da 3 a 5 ore dopo l'assunzione del farmaco o del placebo, sia per misurare il livello di fenilalanina che per eseguire comuni analisi di laboratorio. Veniva eseguito un esame delle urine allo scopo di verificare la normalità dei parametri di funzionalità renale.

Le partecipanti in età fertile venivano sottoposte ad un'analisi delle urine per escludere un'eventuale gravidanza. Se il risultato veniva positivo o dubbio si sarebbe dovuto passare ad un test di gravidanza su siero. Se il test veniva positivo la paziente doveva essere esclusa dallo studio. Le pazienti in età fertile non incinte per poter essere coinvolte nel proseguimento dello studio dovevano astenersi dai rapporti sessuali durante lo studio o usare un metodo accettabile di contraccezione.

I pazienti coinvolti nello studio avevano l'obbligo di riportare in clinica ad ogni visita nelle settimane da 0 a 6 i flaconi di farmaco, compresi quelli vuoti.

Alla visita della settimana 6 venivano consegnate le nuove confezioni di pillole di Phenoptin™ da portare a casa, da assumere al mattino, prima di far colazione, sciolte o in ¼ di litro d'acqua, oppure di succo d'arancia.

Lo studio si concludeva con un'ultima visita alla settimana 14, durante la quale veniva eseguita una visita medica, volta ad accertare lo stato di salute complessivo, durante la quale venivano valutati i segni vitali quali la frequenza cardiaca, la frequenza respiratoria, la pressione arteriosa, la temperatura ed il peso corporeo. Veniva domandato al paziente o ai familiari se erano stati notati effetti sfavorevoli o problemi medici rispetto all'ultima visita.

Alla visita della settimana 14 veniva prelevato un campione di sangue sia per misurare il livello di fenilalanina che per eseguire comuni analisi di laboratorio. Veniva eseguito un esame delle urine allo scopo di verificare la normalità dei parametri di funzionalità renale.

I pazienti coinvolti nello studi PKU-003 avevano l'obbligo di riportare, all'ultima visita (settimana 14) i flaconi vuoti del farmaco.

Risultati dello studio PKU-003

Lo studio PKU-003 ha dato la prova convincente che Phenoptin™ riusciva ad abbassare i livelli di fenilalanina nei pazienti 'responsivi' approssimativamente del 32% rispetto al placebo con una dose giornaliera di 10 mg/kg/die.

Non siamo in grado di poter definire se i tre pazienti siciliani che hanno partecipato allo studio PKU-003 siano stati sottoposti a trattamento con Phenoptin™ oppure con placebo poiché non è stato possibile conoscere, nel dettaglio per ciascun paziente, i valori di fenilalanina che si sono avuti a fine studio.

A conclusione dello studio PKU-003 tutti e tre i pazienti siciliani responsivi a Phenoptin™ nello studio PKU-001 e che avevano preso parte allo studio PKU-003, sono stati inseriti nello studio PKU-004.

Studio PKU-004

Questo studio rappresenta un'estensione dello studio precedente al fine di valutare l'efficacia di Phenoptin™ al dosaggio di 5, 10 oppure 20 mg/Kg/die.

Nel caso della partecipazione allo studio di minori di anni 18 veniva richiesto il consenso di un genitore o tutore. I pazienti maggiorenni dovevano firmare ugualmente un consenso informato prima di partecipare allo studio.

Tutti i dati derivanti dalle visite cliniche, i risultati degli esami di laboratorio e le valutazioni dei livelli di fenilalanina nel sangue venivano registrati sulle schede di raccolta dati (CFR) del paziente. Le schede CFR venivano periodicamente inviate al centro di coordinamento dello studio che provvedeva alla raccolta, alla computerizzazione e alla elaborazione statistica dei dati.

Criteri di inclusione nello studio PKU-004: sono stati inclusi nello studio PKU-004 gli individui affetti da fenilchetonuria che avevano partecipato allo studio precedente di sperimentazione clinica PKU-003, trattati sia con il farmaco Phenoptin™ che con placebo, e che avrebbero soddisfatto tutti i seguenti criteri:

- disponibilità e capacità di fornire un consenso informato scritto o, in caso di minori di anni 18, di fornire un assenso scritto (se richiesto) ed un consenso informato scritto firmato da un genitore o tutore legale, una volta spiegata la natura dello studio e prima di cominciare qualsiasi procedura associata alla ricerca.
- Test negativo di gravidanza all'atto dello screening (per le sole donne di età fertile).
- Disponibilità e capacità di conformarsi a tutte le procedure dello studio.

Criteri di esclusione dallo studio PKU-004: le persone non idonee a partecipare a questo studio comprendevano quanti soddisfavano uno qualsiasi dei seguenti criteri:

- Impresione di inaffidabilità o mancata disponibilità a partecipare allo studio o, nel caso dei minori di anni 18, affidamento a genitori o tutori legali che diano l'impressione di essere inaffidabili o non disponibili.
- Esito positivo del test di gravidanza condotto sull'urina all'atto dello screening (solo donne non sterili di età fertile), gravidanza già in corso o allattamento al seno o pianificazione della gravidanza propria o della partner durante lo studio.
- Le pazienti di età fertile dovevano infatti utilizzare un metodo contraccettivo efficace, come stabilito dall'investigatore principale, ed essere disposte a continuare ad usare misure accettabili per il controllo delle nascite.
- Condizione o affezione concomitante tale da interferire con la partecipazione o la sicurezza dello studio (ad es., epilessia, asma dipendente dall'assunzione per via orale di steroidi o altre condizioni che richiedano l'assunzione orale o parenterale di corticosteroidi, oppure diabete dipendente dall'assunzione di insulina)
- Qualsiasi condizione che, a parere dell'investigatore principale, avrebbe potuto esporre il soggetto a rischi elevati in caso di conformità al trattamento e/o completamento dello studio
- ALT >2 volte il limite normale superiore (ovvero di grado 1 o superiore in base ai criteri di tossicità dell'OMS) all'atto dello screening.
- Uso concomitante di levodopa.

Pazienti e periodo di trattamento

A questo studio hanno preso parte sia i 96 soggetti che avevano partecipato allo studio PKU-003 che, come detto in precedenza, anche altri pazienti provenienti da centri di tutto il mondo, che non avevano partecipato agli studi clinici PKU-001 e PKU-003. Per l'Italia, oltre ai 3 pazienti della Clinica pediatrica di Catania che avevano preso parte agli studi clinici precedenti, ha partecipato anche il

Dipartimento di Pediatria dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" , coinvolgendo nello studio un numero totale di 10 pazienti.

A differenza degli studi precedenti, in questo studio PKU-004 sono stati reclutati anche pazienti fenilchetonurici di età compresa tra i 4 e gli 8 anni.

Lo studio PKU-004 per ciascun paziente è durato 22 settimane e in quel periodo al paziente è stato richiesto di recarsi in clinica 6 volte. Alla prima visita di trattamento (settimana 0) venivano consegnate le pillole di Phenoptin™ da portare a casa, da assumere al mattino, prima di far colazione, sciolte o in ¼ di litro d'acqua, oppure di succo d'arancia.

In occasione di ciascuna visita prevista durante il periodo di trattamento venivano eseguite le seguenti valutazioni ed analisi:

- Visita medica: nelle settimane da 0 a 22 il paziente veniva sottoposto alla visita medica volta ad accertare lo stato di salute complessivo. Venivano inoltre valutati i segni vitali quali la frequenza cardiaca, la frequenza respiratoria, la pressione arteriosa, la temperatura ed il peso corporeo.
- Eventi avversi: ad ogni visita veniva domandato al paziente o ai familiari se erano stati notati effetti sfavorevoli o problemi medici rispetto all'ultima visita. Qualora si fosse verificato un evento avverso il centro di coordinamento dello studio dava comunicazione scritta a tutti gli altri centri partecipanti allo studio, nonché ai relativi comitati etici.
- Farmaci: ad ogni visita veniva chiesto di elencare tutte le medicine che sta prendendo, comprese le vitamine, i prodotti naturali/di erboristeria ed i farmaci da banco acquistati.
- Esami del sangue: In occasione di ciascuna visita condotta durante il periodo di trattamento veniva prelevato un campione di sangue sia per misurare il livello di fenilalanina che per eseguire comuni analisi di laboratorio. Il prelievo

veniva effettuato nel periodo da 3 a 5 ore dopo l'assunzione del farmaco Phenoptin™.

- Esami delle urine: nelle settimane da 0 a 22 venivano raccolti anche i campioni di urina allo scopo di verificare la normalità dei parametri di funzionalità renale.
- Test di gravidanza: le partecipanti in età fertile venivano sottoposte ad un'analisi delle urine per escludere un'eventuale gravidanza nelle settimane da 0 a 22. Se il risultato veniva positivo o dubbio si sarebbe dovuto passare ad un test di gravidanza su siero. Se il test veniva positivo la paziente doveva essere esclusa dallo studio. Le pazienti in età fertile non incinte per poter essere coinvolte nel proseguimento dello studio dovevano astenersi dai rapporti sessuali durante lo studio o usare un metodo accettabile di contraccezione.
- Gestione del farmaco: i pazienti coinvolti nello studio avevano l'obbligo di riportare in clinica ad ogni visita nelle settimane da 0 a 22 i flaconi di farmaco, compresi quelli vuoti.

Risultati dello studio PKU-004

I risultati complessivi dello studio PKU-004 mostrano una chiara risposta alla Phenoptin™ in 128 pazienti, di età superiore ai 4 anni, definiti pertanto 'PKU BH4-responsivi', con differenze statisticamente significative delle variazioni di livello di fenilalanina nel sangue in funzione delle diverse dosi giornaliere di 5, 10, e 20 mg/kg".

I risultati mostrano che l'effetto del trattamento con Phenoptin™ sui livelli di fenilalanina nel sangue (riduzione di oltre il 30%) si è mantenuto stabile per tutto il periodo di studio nelle 22 settimane di studio.

I risultati relativi ai 3 pazienti siciliani coinvolti nello studio PKU-004 hanno dimostrato una buona risposta alle dosi di Phenoptin™ pari a 10 mg/Kg, nei 2 soggetti di sesso maschile, mentre il terzo paziente, di sesso femminile, ha risposto al dosaggio di Phenoptin™ pari a 5 mg/Kg.

Il trattamento con Phenoptin™ al dosaggio sopra menzionato per ciascuno dei 128 pazienti 'responsivi' è proseguito fino all'inserimento degli stessi nello studio PKU-008.

Studio PKU-008

L'obiettivo dello studio clinico sperimentale PKU-008 era quello di valutare la sicurezza del trattamento a lungo termine con Phenoptin™ nei soggetti che avevano partecipato allo studio precedente PKU-004.

Nel caso della partecipazione allo studio di minori di anni 18 veniva richiesto il consenso di un genitore o tutore. I pazienti maggiorenni dovevano firmare ugualmente un consenso informato prima di partecipare allo studio.

A discrezione dell'investigatore, l'ultima valutazione eseguita nel quadro dello studio PKU-004 poteva essere utilizzata per determinare l'idoneità allo studio PKU-008 purché avesse avuto luogo non più di sei settimane prima del giorno 1 dello studio PKU-008. Era possibile usare condizioni obiettive, il peso, gli esami fisici, i test di laboratorio clinico ed i livelli di fenilalanina nel sangue rilevati nel corso dello studio PKU-004 per determinare l'idoneità al PKU-008. Tutti i dati derivanti dalle visite cliniche, i risultati degli esami di laboratorio e le valutazioni dei livelli di fenilalanina nel sangue venivano registrati sulle schede di raccolta dati (CFR) del paziente. Le schede CFR venivano periodicamente inviate al centro di coordinamento dello studio che provvedeva alla raccolta, alla computerizzazione e alla elaborazione statistica dei dati.

I soggetti idonei che hanno partecipato a questo studio hanno iniziato il trattamento con Phenoptin™ il giorno 1 ad una dose equivalente a quella ottimizzata durante lo studio precedente (5, 10 o 20 mg/Kg).

Come negli studi precedenti le compresse di Phenoptin™ venivano somministrate oralmente una volta al giorno da assumere al mattino, prima di far colazione, sciolte o in ¼ di litro d'acqua, oppure di succo d'arancia.

I soggetti sono stati riforniti di compresse di Phenoptin™ fino a quando il farmaco non è diventato disponibile a seguito della concessione dell'appropriata autorizzazione alla messa in commercio.

Phenoptin™ veniva distribuito all'atto del reclutamento, dopo il completamento di tutte le valutazioni del giorno 0, e successivamente ad intervalli mensili.

Le visite previste dallo studio venivano svolte ogni tre mesi, per circa due anni. Durante ciascuna visita venivano svolte le valutazioni sulla sicurezza. La sicurezza è stata valutata monitorando gli eventi sfavorevoli (AE), gli eventi sfavorevoli gravi (SAE) ed i segni obiettivi, svolgendo esami fisici ed eseguendo i test di laboratorio (test chimici, ematologici, del livello della fenilalanina nel sangue ed analisi delle urine).

Criteri di inclusione nello studio PKU-008: sono stati inclusi nello studio PKU-008 gli individui affetti da fenilchetonuria che avevano partecipato allo studio precedente di sperimentazione clinica PKU-004 e che avrebbero soddisfatto tutti i seguenti criteri:

- disponibilità e capacità di fornire un consenso informato scritto o, in caso di minori di anni 18, di fornire un assenso scritto (se richiesto) ed un consenso informato scritto firmato da un genitore o tutore legale, una volta spiegata la natura dello studio e prima di cominciare qualsiasi procedura associata alla ricerca.
- Test negativo di gravidanza all'atto dello screening (per le sole donne di età fertile).
- Disponibilità e capacità di conformarsi a tutte le procedure dello studio.

Criteri di esclusione dallo studio PKU-008: le persone non idonee a partecipare a questo studio comprendevano quanti soddisfacevano uno qualsiasi dei seguenti criteri:

- Mancata risposta al trattamento precedente con Phenoptin™ durante la partecipazione allo studio PKU-004.
- Impressione di inaffidabilità o mancata disponibilità a partecipare allo studio o, nel caso dei minori di anni 18, affidamento a genitori o tutori legali che diano l'impressione di essere inaffidabili o non disponibili.
- Conclusione anticipata della partecipazione al PKU-004.
- Uso di qualsiasi altro farmaco sperimentale diverso da Phenoptin™ nel corso dei 30 giorni precedenti lo screening, o previsione d'uso di un qualsiasi altro farmaco sperimentale diverso da Phenoptin™ prima del completamento di tutte le valutazioni programmate ai fini di questo studio.
- Esito positivo del test di gravidanza condotto sull'urina all'atto dello screening (solo donne non sterili di età fertile), gravidanza già in corso o allattamento al seno o pianificazione della gravidanza propria o della partner durante lo studio
- Le pazienti di età fertile dovevano usare un metodo contraccettivo efficace, come stabilito dall'investigatore principale, ed essere disposte a continuare ad usare misure accettabili di controllo delle nascite.
- Condizione o affezione concomitante tale da interferire con la partecipazione o la sicurezza dello studio (ad es., epilessia, asma dipendente dall'assunzione per via orale di steroidi o altre condizioni che richiedano l'assunzione orale o parenterale di corticosteroidi, oppure diabete dipendente dall'assunzione di insulina).
- Qualsiasi condizione che, a parere dell'investigatore principale, esponga il soggetto a rischi elevati in caso di conformità al trattamento e/o completamento dello studio.
- ALT >2 volte il limite normale superiore (ovvero di grado 1 o superiore in base ai criteri di tossicità dell'OMS) all'atto dello screening.

- Grave malattia neuropsichiatrica (ad es., depressione grave) non soggetta a controllo medico corrente.
- Antecedenti di trapianto di organi.
- Necessità di trattamento concomitante con qualsiasi altro farmaco di cui si conosca l'attività inibente la sintesi del folato (ad es., metotrexato).
- Uso concomitante di levodopa.

Pazienti e periodo di trattamento

Per lo studio PKU-008 sono stati reclutati un totale di 128 pazienti, di età superiore ai 4 anni, provenienti dallo studio PKU-004 e risultati 'responsivi' al trattamento con Phenoptin™. Appartenevano a questo gruppo anche i 3 pazienti siciliani che avevano partecipato e risposto positivamente agli studi precedenti.

Il farmaco Phenoptin™ è stato fornito sotto forma di compresse da 100 mg ciascuna di idrocloruro di sapropterina. Il Phenoptin™ utilizzato nello studio PKU-008 era confezionato come segue: a) flaconi da 45 pastiglie cadauno, b) flaconi da 120 pastiglie cadauno.

Phenoptin veniva assunto oralmente una volta al giorno, calcolando il numero di pastiglie da prendere in funzione della dose finale prescritta nel corso dell'ultimo studio (PKU-004). Tutte le dosi del farmaco dovevano essere assunte al mattino, prima di fare colazione. La durata del trattamento era di circa tre anni, a meno che il farmaco non fosse messo in commercio prima della conclusione di tale periodo.

PIANO DI RICERCA DELLO STUDIO PKU-008

VALUTAZIONE ^a	Giorno 0 ^b	Giorno 1 ^c	Giornalmente ^d	Mensilmente ^e	Ogni 3 mesi	Conclusione o ritiro anticipato
Consenso informato ^f	X					
Condizioni obiettive e peso	X			X		X
Anamnesi	X					
Visita medica	X			X		X
Test di laboratorio clinico ^g	X			X		X
Test della gravidanza ^h	X			X		X
Farmaci concomitanti	X			X		X
Eventi sfavorevoli	X			X		X
Livelli di fenilalanina nel sangue ⁱ	X			X		X
Distribuzione del farmaco allo studio ^{l, m}	X			X	X	
Somministrazione del farmaco allo studio		X	X			

^a Tutte le visite devono avere luogo entro 7 giorni dai punti temporali previsti (ovvero ± 7 giorni). I soggetti che non si presentano in clinica per la visita prefissata continueranno ad essere tenuti ad aderire al piano originale di visite per tutte le visite rimanenti. I soggetti che si presentano in ritardo ad una visita in clinica devono continuare ad assumere Phenoptin ogni giorno nel modo prescritto.

^b A discrezione dell'investigatore, l'ultima valutazione eseguita nel quadro dello studio PKU-004 può essere usata per determinare l'idoneità allo studio PKU-008, purché abbia avuto luogo non più di sei settimane prima del giorno 1 dello

studio PKU-008. Nel caso dei partecipanti al PKU-004, è possibile usare condizioni obiettive, il peso, gli esami fisici, i test di laboratorio clinico ed i livelli di fenilalanina nel sangue rilevati nel corso dello studio PKU-004 per determinare l'idoneità al PKU-008.

I risultati possono essere registrate sulle schede di raccolta dati CFR del giorno 0 dello studio PKU-008. Gli ulteriori test di laboratorio clinico e valutazioni del fenilalanina nel sangue verranno eseguiti e registrati sulle schede di raccolta dati CFR del giorno 0 del PKU-008.

Tutte le altre valutazioni del giorno 0 devono essere condotte durante la visita del giorno 0, dopo la firma del consenso informato (o dell'assenso, se applicabile). Se i test di laboratorio clinico o le valutazioni della fenilalanina nel sangue del giorno 0 sono stati condotti sei settimane o più prima del giorno 1 dello studio PKU-008, è necessario condurre una visita separata per eseguire tali valutazioni di laboratorio.

^c La prima dose di Phenoptin™ va somministrata nel corso del giorno 1 dello studio.

^d Phenoptin va assunto oralmente ogni giorno al mattino, prima di fare colazione. Ai fini di questo studio, per colazione si intende la bevanda o il cibo che il soggetto è solito consumare quale prima colazione, prima di mezzogiorno.

^e Una volta al mese, gli investigatori distribuiranno il farmaco allo studio ai soggetti. Ciò può avvenire in concomitanza a con tutte le altre valutazioni da completare ogni tre mesi.

^f Il consenso informato deve essere ottenuto prima di svolgere alcuna procedura dello studio.

^g I test di laboratorio clinico comprendono analisi ematologiche, chimiche e delle urine (condotte presso il laboratorio centrale).

^h Test ripetuti della gravidanza verranno eseguiti in caso di risultati positivi o dubbi delle analisi delle urine.

ⁱ La fenilalanina nel sangue va misurata 3 -5 ore dopo il pasto. I campioni di sangue di un soggetto devono essere prelevati a circa la stessa ora

del giorno in occasione di ciascuna visita e verranno analizzati da un laboratorio centrale. Se un livello della fenilalanina nel sangue eccede la gamma accettata, basata sull'età e sui livelli ematici precedenti della fenilalanina del soggetto, e le direttive del centro locale, il monitor medico e l'investigatore principale determineranno se sia necessario o meno provvedere ad una ulteriore misurazione di follow-up del livello della fenilalanina nel sangue.

^l È necessario svolgere tutte le altre valutazioni del giorno 0 prima di distribuire il farmaco allo studio in tale data.

^m La dose può essere aumentata o ridotta a seconda delle necessità ed a discrezione dell'investigatore, per incrementi di circa 5 mg/kg/die entro una gamma da 5 mg/kg/die a 20 mg/kg/die, in modo da controllare il livello della fenilalanina nel sangue conformemente a quanto suggerito in proposito dal centro clinico locale.

Valutazione della sicurezza

La sicurezza è stata valutata monitorando sia i livelli della fenilalanina nel sangue dei soggetti partecipanti allo studio PKU-008, sia l'incidenza e la frequenza di tutti gli eventi avversi sfavorevoli (AE) e gli eventi avversi sfavorevoli gravi (SAE) verificatisi durante lo studio. La sicurezza è stata dunque valutata rispetto al tasso ed al tipo di eventi sfavorevoli, alle modifiche clinicamente significative delle condizioni obiettive e/o dei risultati degli esami fisici ed alle modifiche statisticamente significative dei risultati dei test di laboratorio, chimici ed ematologici e del livello plasmatico della fenilalanina. I livelli della fenilalanina nel sangue venivano determinati ogni mese. Il prelievo veniva eseguito in un periodo compreso tra 3 e 5 ore dall'assunzione delle compresse di Phenoptin™.

Tutti i dati derivanti dalle visite cliniche, i risultati degli esami di laboratorio e le valutazioni dei livelli di fenilalanina nel sangue venivano registrati sulle schede di raccolta dati (CFR) del paziente. Le schede CFR venivano periodicamente inviate al centro di coordinamento dello studio che provvedeva alla raccolta, alla computerizzazione e alla elaborazione statistica dei dati.

Sono state elaborate tabelle statistiche descrittive di riassunto dei risultati di laboratorio e delle condizioni obiettive dei soggetti dal centro di coordinamento dello studio.

Gli eventi avversi sfavorevoli venivano registrati sin dalla prima visita dello studio fino alla visita finale dello studio e gli eventi sfavorevoli gravi venivano registrati dal momento in cui i soggetti compilano il consenso informato fino alla visita finale dello studio.

Come per gli altri studi precedenti, nel caso evento avverso il centro di coordinamento dello studio dava comunicazione scritta a tutti gli altri centri partecipanti allo studio, nonché ai relativi comitati etici.

Le tabelle dell'elaborazione statistica dei dati, prodotte dal centro di coordinamento, riportavano le sommatorie e le percentuali di tutti gli AE e SAE rilevati nel corso dello studio. Nel caso degli eventi sfavorevoli e gravi che si verificano in oltre il 5 per cento della popolazione allo studio, l'insorgenza dell'evento veniva rappresentata graficamente. Tutti gli AE venivano codificati e riassunti in funzione del sistema organico e della definizione desunta dal dizionario di codifica Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA o dizionario medico per le attività regolamentari).

Il campione analizzato di 128 soggetti è stato ritenuto un campione statistico sufficientemente ampio per la valutazione degli eventi avversi che si verificano poco frequentemente nella popolazione complessiva. Se la somministrazione delle compresse di Phenoptin™ è associata ad un tasso triennale di eventi avversi dell'1 per cento e se tutti i soggetti vengono seguiti per un periodo di 3 anni, la probabilità di almeno una ricorrenza di tale evento avverso è leggermente superiore al 72 per cento. Se il tasso di eventi avversi aumenta elevandosi ad una percentuale del 2 o al

3 per cento, la probabilità di almeno una ricorrenza passa al 92 ed al 98 per cento, rispettivamente. Eventi avversi con un'incidenza triennale di almeno il 4 per cento avranno oltre il 99 per cento di probabilità di verificarsi almeno una volta in tre anni.

Risultati dello studio PKU-008

Lo studio PKU-008 si è concluso in anticipo rispetto al periodo prefissato dei 3 anni, dal momento che la FDA ha dato la sua approvazione riguardo l'efficacia e la sicurezza del Phenoptin™ dopo circa un anno e mezzo dall'inizio dello studio.

A conclusione dello studio PKU-008 la FDA riporta un'incidenza di eventi avversi del 4% nei pazienti trattati con Phenoptin™. Gli eventi avversi registrati riguardavano una condizione di neutropenia e un abbassamento dei livelli di pressione arteriosa.

Non sono stati segnalati eventi avversi gravi durante lo studio PKU-008 nei soggetti trattati con Phenoptin™.

L'approvazione da parte della FDA è avvenuta alla fine del 2008. Il farmaco è stato inserito nel prontuario nel mese di settembre 2009, con in nome di Kuvan®, sotto forma farmaceutica di compresse da 100 mg di sapropterina dicloroidrato. La casa farmaceutica Merck Serono è titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio.

La stessa ha assicurato la dispensazione del farmaco per 'uso compassionevole' a tutti i pazienti che avevano partecipato allo studio PKU-008, fino al momento dell'immissione del Kuvan® in commercio.

Informazioni dettagliate sul Kuvan® sono disponibili presso il sito web dell'agenzia Europea per i medicinali (EMA) www.emea.europa.eu e sul sito www.kuvan.com.

Considerazioni conclusive

La sperimentazione clinica con Phenoptin™ (idrocloreuro di sapropterina) in soggetti affetti da fenilchetonuria si è resa necessaria per dimostrare la sicurezza e l'efficacia di tale molecola quale terapia alternativa alla dieta per la cura della fenilchetonuria, al fine di ottenere l'approvazione per l'immissione in commercio da parte della FDA.

Nel 2008, dopo tre anni di sperimentazione clinica, articolata negli studi PKU-001, PKU-003, PKU-004 e PKU-008, iniziata nel 2005 e conclusasi nel 2009 con un anticipo di circa un anno e mezzo rispetto ai tempi previsti, la FDA ha dato la sua approvazione all'immissione in commercio del Phenoptin™ con il nome commerciale di Kuvan®.

Questo risultato rappresenta un momento altamente significativo per la ricerca scientifica ed un traguardo per tutti coloro che hanno sperato in una via terapeutica della fenilchetonuria alternativa al trattamento dietetico.

Sicuramente, in seguito alla sperimentazione clinica con Phenoptin™ oggi nel mondo vi sono alcuni soggetti affetti da fenilchetonuria, e tra questi anche i 3 pazienti siciliani che hanno preso parte alla sperimentazione, che hanno tratto beneficio dal trattamento con Kuvan® poiché ciò ha permesso loro di liberalizzare la loro dieta.

Tuttavia esistono talune perplessità riguardanti il confronto tra rischi e benefici circa il trattamento con Kuvan® pubblicate online sul sito www.pku.altervista.org e sulla rivista National PKU News che riteniamo doveroso riportare qui di seguito al fine di giungere a conclusioni obiettive sull'utilizzo del Kuvan®.

Premesso che il trattamento dietoterapeutico per la cura della fenilchetonuria si è dimostrato essere molto sicuro e dopo circa 40 anni dalla sua introduzione non si conoscono effetti indesiderati, è comunque indiscusso che l'accettazione della dieta negli adolescenti e negli adulti è difficile per tutti gli aspetti psico-sociali che essa comporta.

L'approvazione da parte della FDA all'immissione in commercio del Kuvan® certamente rappresenta la speranza per i pazienti affetti da fenilchetonuria e per le

loro famiglie, di un nuovo trattamento terapeutico che possa mettere fine alla dietoterapia.

La decisione da parte della FDA di permettere l'approvazione del Kuvan® è stata fortemente criticata per i seguenti motivi:

1) la sperimentazione clinica si è basata unicamente sull'abbassamento dei livelli plasmatici della fenilalanina quale parametro su cui valutare l'efficacia del Kuvan®. La FDA avrebbe dovuto obbligare la Biomarin a presentare un piano di follow-up a lungo termine, che includesse marcatori clinici neuropsicologici, al fine di valutare al meglio i benefici potenziali del trattamento. Utilizzare solo il livello di fenilalanina plasmatica non rappresenta infatti un marcatore clinicamente significativo poiché esso non è l'unico responsabile della funzionalità neurocognitiva del soggetto affetto da fenilchetonuria. Si ritiene inoltre che la FDA avrebbe dovuto richiedere studi di opportuna ampiezza e durata per valutare inoltre l'effetto del Kuvan® sullo sviluppo intellettuale e la condizione neuropsicologica. Non sappiamo inoltre se il Kuvan® perde la sua efficacia con un uso a lungo termine.

2) Occorre notare inoltre che gli studi clinici condotti dalla Biomarin hanno dimostrato una riduzione dei livelli plasmatici della fenilalanina dopo la somministrazione di Kuvan® solo in alcuni pazienti e precisamente su quelli che erano affetti da varianti lievi di fenilchetonuria e che presentavano, a dieta semi-libera, valori di fenilalanina intorno ai 12 mg/dl. I risultati dello studio PKU-001 condotto su un campione di 498 pazienti mostrano infatti una riduzione della fenilalaninemia di circa il 30 % rispetto ai valori iniziali, dopo 8 giorni di trattamento ad un dosaggio di 10 mg/Kg, in 96 soggetti considerati pertanto 'responsivi'. Questo studio ha dimostrato che il trattamento con Kuvan® non funziona nei soggetti affetti da fenilchetonuria classica con elevati livelli di fenilalanina plasmatici.

3) Un altro problema importante è dato dalla sicurezza del Kuvan® per la quale la Biomarin ha organizzato lo studio PKU-008, la cui conclusione, avvenuta prima dei tempi stabiliti, ha consentito l'immissione in commercio del farmaco. Il rapporto della FDA conclude dicendo che "...la durata di esposizione era adeguata per sostenere la sicurezza a lungo termine". C'è chi ritiene invece che la sicurezza del farmaco sia stata verificata per un periodo troppo breve, su un numero ristretto di pazienti e nessuno con età inferiore a 4 anni. Quest'ultimo dato è di fondamentale importanza dal momento che il Kuvan® deve essere assunto sin dall'infanzia ed usato per tutta la vita.

4) Un ultimo punto fonte di discussione è rappresentato dall'alto costo di tale trattamento e l'incertezza considerevole che riguarda la copertura della spesa da parte del Servizio Sanitario Nazionale.

In conclusione, non è stato dimostrato che l'uso del Kuvan® previene le conseguenze neurologiche negative associate alla fenilchetonuria in nessun test clinico, rispetto ad una dieta povera di fenilalanina, la cui efficacia è stata lungamente dimostrata. Nessuno ha dimostrato che il Kuvan® sia realmente sicuro. Il farmaco è stato verificato per un periodo troppo breve e su un numero troppo ristretto di pazienti e nessuno con età inferiore a 4 anni.

Rimane da verificare la sicurezza del farmaco a lungo termine. Prima di assumere un farmaco occorre essere consapevoli dei rischi e dei benefici ed è improbabile che ci siano solo benefici. Inoltre, occorre tener conto che molte medicine sono assunte solo per brevi periodi e quindi i rischi possono essere tenuti sotto controllo (o bassi per brevi periodi); il Kuvan® invece deve essere assunto sin dall'infanzia e usato per tutta la vita, anche se dovranno trascorre molti decenni prima di riuscire a stabilire se realmente il farmaco possa definirsi sicuro.

BIBLIOGRAFIA

1. Scriver C. R., Beaudet L. A., Sly S. W., Valle D.: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. VII Ed. – McGraw Hill Ed.
2. Fernandes J., Saudubray J. M., Van Den Berg G.: *Inborn metabolic diseases*. III Ed. – Springer Ed.
3. Giovannini M, Riva E, Biasucci G.: *Fenilchetonuria da difetto di idrossilasi e da difetto di cofattore. Possibilità di terapia*. Riv. Ped. Sic. Anno XLVI, Gen-Apr 1991, N.1-2, 40-59.
4. Ponzone A.: *Le iperfenilalaninemie: dallo screening alle diagnosi*. *Pediatrica*, 1998, 4:29-37.
5. Ponzone A., Ferraris S., Guardamagna O.: *Le fenilchetonurie da difetto di BH4*. *Aggiornamento del Medico*, 1986, 9, 2:131.
6. Folling A.: *Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensaure in den harn as Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillitat*. *Physiol Chem* 1934, 227:169-176.
7. Meli C., Garozzo R., Chiara G., Caruso D., Monaco V., Bianca S. e Mollica F.: *Le iperfenilalaninemie nella popolazione siciliana. Risultati di 10 anni di un protocollo di diagnosi e follow-up*. Atti 11° Congresso Nazionale FISME. Spoleto 9-12 Ottobre 1996.
8. Kaufman S.: *An evaluation of the possible neurotoxicity of metabolites of phenylalanine*. *J. Pediatr.* 114:885-900, 1989.
9. Hommes F. A., Eller A. G., Taylor E. H.: *Turnover of the components of myelin and myelin proteins in experimental hyperphenylalaninemia. Relevance to termination of dietary treatment in human PKU*. *J. Inher. Metab. Dis.* 5,21, 1982.
10. Guthrie R.: *Blood screening for phenylketonuria*. *Jama* 178, 8653, 1961.
11. Bickel H.: *Influence of phenylalanine intake on phenylketonurics*. *Lancet* 2, 812, 1953.
12. Giovannini M.: *utilità e limiti del trattamento dietetico delle iperfenilalaninemie*. *Riv. Ital. Ped.* 11, 513, 1985.
13. Giovannini M., Riva E., Segrè A., Episcopi M. E.: *A practical approach to dietary management of phenylketonuria*. *Perspective in Inh. Met. Dis.* 1, 1978.
14. Giovannini M., Longhi R., Riva E., Cerone R., Burlina A.: *Protocollo per la dietoterapia delle iperfenilalaninemie*. *Gruppo di studio di Nutrizione della Società Italiana di Pediatria*. *Riv. Ital. Pediatr.* 11,4,434,1985.
15. Longhi R., Riva E., Turrini D., Carcano G., Fiocchi A., Rottoli A.: *Controllo nutrizionale nei bambini fenilchetonurici in dietoterapia: gli oligoelementi*. *Riv. Ital. Ped.* 9:363,1983.

- 16.** Rottoli A.: *Valutazione del Selenio plasmatico in pazienti fenilchetonurici in dietoterapia.* Atti Simposio Internazionale "aminoacidopatie". Genova-Rapallo 15/17 Marzo 1984.
- 17.** Carcano G., Magnolfi C., Carcano M., Fiocchi A., Riva E.: *Rachitismo da deficit di magnesio.* San Paolo, 27, 1, 1981.
- 18.** Lisi R., Testa R., Distefano A., Meli C.: *Studio di alcuni parametri ematologici in soggetti fenilchetonurici sottoposti a dietoterapia.* Riv. Ped. Sic. Fasc. 3-4, Maggio-Agosto 1990.
- 19.** Mollica F., Meli C., Di Raimondo S. A., Lisi R.: *Unexpectedly high prevalence of the less severe forms of phenylalanine Hydroxylase (PAH) deficiency in Sicily.* 2nd International Workshop on phenylketonuria.
- 20.** Guettler F., Guldborg P.: *The influence of mutations on enzyme activity and phenylalanine tolerance in phenylalanine hydroxylase deficiency.* Eur. J. Pediatr. 1996, 155 Suppl. 1:506-510.
- 21.** Tada K., Yoshida T., Mochizuku K., Konno T., Nakagawa H., Yokoyama Y., Takada G., Arakawa T.: *Two siblings of hyperphenylalaninemia: suggestion to a genetic variant of phenylketonuria.* Tohoku J Exp Med. 1969; 100:249-253.
- 22.** Smith I.: *Atypical phenylketonuria accompanied by a severe progressive neurological illness unresponsive to dietary treatment.* Arch Dis Child. 1974; 49:245.
- 23.** Smith I., Clayton BE., Wolff OH.: *New variant of phenylketonuria with progressive neurological illness unresponsive to phenylalanine restriction.* Lancet. 1975; 1:1108-1111.
- 24.** Bartholome K A.: *New molecular defect in phenylketonuria.* Lancet. 1974;2:1580.
- 25.** Sawada Y., Shintaku H., Isshiki G.: *Neopterin and biopterin concentrations in cerebrospinal fluid in controls less than 1 year old.* Brain Dev 1999 Jun;21(4):264-7.
- 26.** Romano C., Cerone R., Schiaffino M. C., Caruso U. et al.: *Accertamento diagnostico, nosografia, principi di trattamento delle iperfenilalaninemie.* Rapporto tecnico SISN. Riv Ital. Pediatr. 1997;23:1040-1044.
- 27.** Thony B., Leinbacher W., Blau N., Harvie A., Heizmann C. W.: *Hyperphenylalaninemia due to defects in tetrahydrobiopterin metabolism: molecular characterization of mutations in 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase.* Am. J. Hum. Genet. 54:782-792, 1994.
- 28.** Oppliger T., Thony B., Kluge C., Matasovic A., Heizmann C. W., Ponzzone A., Spada M., Blau N.: *Identification of mutations causing 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase deficiency in four Italian families.* Hum. Mutat. 10: 25-35, 1997.

- 29.** Liu T., Hsiao K., Lu S., Wu S., Wu K., Chiang S., Liu X., Chen R., Yu W.: *Mutation analysis of the 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase gene in chinese hyperphenylalaninemia caused by tetrahydrobiopterin synthesis deficiency.* Hum. Mutat. 11:76-83,1998.
- 30.** Imamura T., Okano Y., Shintaku H., Hase Y., Isshiki G.: *Molecular characterization of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency in Japanese patients.* J Hum Genet 1999;44(3): 163-8.
- 31.** Zekanowski C., Nowacka M., Sendekca E., Sowik M., Cabalska B., Bal J.: *Identification of mutations causing 6-pyruvoyl-tetrahydrobiopterin synthase deficiency in polish patients with variant hyperphenylalaninemia.* Mol Diagn 1998 Dec; 3(4): 237-239.
- 32.** Hanihara T., Inoue K., Kawanishi C., Sugiyama N., Miyakawa T., Onishi H., Yamada Y., Osaka H., Kosaka K., Iwabuchi K., Owaka M.: *6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency with generalized dystonia and diurnal fluctuation of symptoms: a clinical and molecular study.* Mov Disord 1997 May; 12(3): 408-11.
- 33.** Blau N., Scherer-Oppliger T., Baumer A., Riegel M., Matasovic A., Schinzel A., Jaeken J., Thony B.: *Isolated central form of tetrahydrobiopterin deficiency associated with hemizyosity on chromosome 11q and a mutant allele of PTPS.* Hum Mutat 2000 Jul; 16(1): 54-60.
- 34.** Schere-Oppliger T., Matasovic A., Laufs S., Levy HL., Quackenbush EJ., Blau N., Thony B.: *Dominant negative allele (N47D) in a compound heterozygote for a variant of 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase deficiency causing transient hyperphenylalaninemia.* Hum Mutat 1999; 13(4): 286-9.
- 35.** Romstad A., Guldborg P., Blau N., Guttler F.: *Single-step mutation scanning of the 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase gene in patients with hyperphenylalaninemia.* Clin Chem 1999 Dec; 45(12): 2102-8.