

STUDIO CLINICO OSSERVAZIONALE

**INSONNIA FATALE FAMILIARE: TRATTAMENTO
PREVENTIVO CON DOXICICLINA DI SOGGETTI A RISCHIO**

PROTOCOLLO

3 settembre 2010

Background

Le malattie da prioni encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE), sono malattie sporadiche, prevalentemente ereditarie, infettive e mortali. L'evento chiave nella loro patogenesi è la conversione conformazionale della proteina prion normale (PrPc) in una isoforma patogena (isoforma scrapie PrPsc) ad alto contenuto di beta-sheet (2). PrPsc si accumula nel sistema nervoso centrale delle persone colpite in una forma detergente-insolubile, resistente alle proteasi, costituendo un insolito tipo di particelle infettive (prioni) prive di acido nucleico. Le malattie da prioni identificate neuropatologicamente sono il Kuru, la Malattia di *Creutzfeldt Jacob* (CJD), la Sindrome di *Gerstmann Straussler Scheinker* (GSS) e l'Insonnia Familiare Fatale (FFI). CJD è caratterizzata dal punto di vista clinico patologico da demenza progressiva, mioclono, cecità corticale, atassia rigidità, mutismo acinetico associato a perdita cerebrale, spongiosi neuronale e gliosi. GSS è un'atassia cerebellare con placche amiloidi in diverse zone del cervello. FFI è caratterizzata da insonnia progressiva, iperattivazione del sistema autonomico e anomalie motorie (3). Dal punto di vista neuropatologico nella FFI si rilevano importanti degenerazioni del talamo, con selettivo coinvolgimento dei nuclei talamici antero ventrale e dorso mediale, inoltre è colpita l'oliva e si rinvencono isolati focolai di spongiosi in corteccia. Le malattie familiari da prioni, costituiscono il 10-15% dei casi di CJD, GSS e FFI, sono a trasmissione autosomica dominante e sono caratterizzate da inserzionali mutazioni puntiformi nel gene della PrP (PRNP) sul cromosoma 20. (4). Si ritiene che queste mutazioni favoriscano la conversione spontanea di PrPc in PrPsc. Anche se ogni mutazione causa un fenotipo specifico, le malattie da prioni mostrano una notevole variabilità clinica e neuropatologica. Inoltre il loro fenotipo è profondamente condizionato da un comune polimorfismo Met/Val al codone 129. Le basi molecolari di questa variabilità sono poco conosciute. FFI è associata ad una mutazione puntiforme (GAC-AAC) nel codone 178 della PRPN con sostituzione di asparagina con acido aspartico e associata a metionina (Met) nel codone polimorfo 129 dell'allele mutato(5). Inoltre il polimorfismo 129 nell'allele non mutato determina la gravità della malattia: Met/Met è caratterizzato da breve durata della malattia e gravi danni al talamo con minori alterazioni alla corteccia, mentre l'eterozigosi Met/Val presenta un allungamento della durata della malattia con diffusi danni neuropatologici cortico-spongiosi. E' interessante notare che la stessa mutazione D178N in associazione con una valina al codone 129 dell'allele mutato causa una forma familiare di CJD con fenotipo clinico patologico senza insonnia e con

selettiva atrofia del talamo(6). Questo costituisce l'esempio più chiaro di come mutazioni nel gene PRNP possano produrre fenotipi sorprendentemente diversi(7). La FFI è stata descritta da Lugaresi (1) che ha delineato il caso di un uomo di 53 anni con insonnia progressiva e disautonomia; sogno come realtà, disartria, tremore, mioclono e successiva evoluzione verso il coma e la morte dopo nove mesi. Due sorelle del paziente e numerosi altri parenti nell'arco di tre generazioni erano deceduti a causa di una malattia simile. Studi anatomopatologici del cervello hanno dimostrato grave degenerazione neuronale, con astrocitosi reattiva limitata ai nuclei anteriori e dorso mediali del talamo, senza spongiosi o alterazioni vascolari infiammatorie. Successivamente gli stessi autori hanno individuato i segni clinici e neuroanatomopatologici in 5 nuovi casi (8). Uomini e donne sono interessati secondo trasmissione autosomica dominante. L'età d'esordio varia tra i 37 e i 61 anni, anche se sono stati descritti alcuni casi con esordio entro i 30 anni(9). La durata media si aggira sui 13 mesi con un intervallo variabile tra i 7 e i 25 mesi. La prima descrizione clinica della FFI nasce dall'osservazione del dottor Ignazio Roiter che ebbe l'opportunità di osservare tre fratelli e che comprese di trovarsi di fronte ad una nuova entità nosografica in cui l'alterazione del sonno costituiva il primo sintomo. Il terzo paziente fu accolto nella clinica Neurologica di Bologna diretta dal Prof. Lugaresi, e qui i suoi sintomi sono stati sistematicamente analizzati e caratterizzati. Il paziente morì pochi mesi dopo. In quel periodo il dott. Roiter avviò una ricerca genealogica sulla famiglia dei soggetti ammalati per poter individuare l'antenato più lontano. Il risultato di questo lavoro è ora disponibile per l'analisi sistematica. Il dott. Roiter ha fondato l'Associazione Familiari Insonnia Familiare Fatale e malattie da prioni (<http://www.afiff.org>), che comprende essenzialmente tutti i membri delle famiglie con casi di FFI. L'obiettivo principale di questa associazione è di sostenere le vittime di questa devastante malattia e i loro parenti, ed aumentare la sensibilità della gente verso la FFI e le altre malattie da prioni. Molti membri dell'associazione hanno espresso al dott. Roiter la loro disponibilità a partecipare a studi clinici finalizzati alla comprensione della biologia della malattia, con la speranza che ciò possa portare allo sviluppo di terapie efficaci. Ciò rappresenta un'opportunità senza precedenti di caratterizzare clinicamente una numerosa popolazione a rischio di sviluppare una malattia genetica da prioni. L'indagine genetica su 85 soggetti appartenenti a questa famiglia ha permesso di individuare 22 portatori della mutazione D178N (di età compresa tra i 34 e 82 anni). L'analisi storica dei casi precedenti (38) indica che l'età di rischio massimo è compresa tra i

50 e i 55 anni. In base a ciò il trattamento con doxiciclina è stato proposto ai soggetti di età compresa tra i 42 e i 52 anni.

Razionale del trattamento preventivo con doxiciclina

L'uso delle tetracicline come farmaci efficaci nella terapia delle TSE, è stato introdotto per analogia con la iododoxorubicina, un farmaco anti-tumorale che da indicazioni cliniche e in alcuni modelli sperimentali si era mostrato efficace nel ridurre l'accumulo di proteine amiloidogeniche. Le tetracicline hanno un profilo tossicologico più rassicurante rispetto le antracicline ed inoltre alcuni derivati, minociclina e doxiciclina, passano in maniera soddisfacente la barriera emato-encefalica. A livello sperimentale le tetracicline, doxiciclina e tetraciclina, si sono dimostrate in grado di interferire efficacemente con le forme patologiche di proteina prion (PrP^{Sc}) sia in modelli *cell-free* che in colture cellulari (Tagliavini et al 2000), che in modelli animali di malattie da prioni (lo *scrapie* sperimentale (Forloni et al 2002, De Luigi et al 2008). Inoltre, l'attività anti-amiloidogenica delle tetracicline è stata osservata in numerosi modelli di malattie con accumulo proteico, compresa la Malattia di Alzheimer (Forloni 2001), con risultati incoraggianti (Forloni 2009). In assenza di altre terapie efficaci, la doxiciclina è stata proposta come trattamento compassionevole a pazienti con CJD (100 mg/die). Questo trattamento è stato proposto in Italia nel centro clinico specializzato per TSE dal 1996 e in Germania a partire dal 2005. In entrambi gli studi osservazionali il trattamento con doxiciclina al momento della comparsa dei sintomi della malattia ha notevolmente prolungato la sopravvivenza dei pazienti CJD. Nello studio tedesco l'effetto di doxiciclina sembra limitato ai portatori del polimorfismo 129 M/M, nello studio italiano la maggior parte dei pazienti trattati erano 129 M/M perciò non è stato possibile verificare l'influenza del polimorfismo 129 sull'effetto del farmaco. Comunque i soggetti FFI che saranno arruolati sono tutti 129 M/M. L'effetto positivo sulla sopravvivenza dei soggetti CJD era incoraggiante, uno studio formale in doppio cieco contro placebo è in corso per confermare i risultati. Tuttavia l'aggressività delle malattie da prioni, compresa FFI, che porta a morte in pochi mesi dall'esordio, concede poche speranze curative a trattamenti che iniziano quando la malattia è conclamata. Diventa quindi ragionevole testare effetti preventivi in soggetti a rischio di sviluppare la malattia. La disponibilità dei membri della famiglia FFI di Treviso riunita in un'associazione consente di attuare questo studio

preventivo in un contesto quasi unico, visto la rarità della malattia in esame. Lo *screening* genetico ha consentito di individuare i soggetti portatori della mutazione D178N/M129 all'interno della famiglia e l'analisi storica ha permesso di identificare l'età a maggior rischio di sviluppare la malattia. Il disegno sperimentale tiene conto della numerosità modesta e della età a rischio e si fa carico anche della necessità di non rendere palese la genotipizzazione.

Obiettivi dello studio

Evitare l'insorgenza della malattia FFI in soggetti appartenenti alla famiglia in esame e portatori di mutazione D178N/M129 della proteina prionica, mediante somministrazione di doxiciclina 100 mg per os/die, costituendo un approccio terapeutico valido per le malattie prioniche in genere. La sopravvivenza dei soggetti trattati sarà valutata dopo 11 anni (10 anni di osservazione + 1 corrispondente al tempo di esposizione minima al farmaco)

Soggetti e metodi

Criteria di inclusione

Uomini e donne appartenenti alla famiglia FFI di Treviso con età compresa tra i 42 e 52 anni al momento del reclutamento, genotipizzati per la mutazione D178N/M129 della proteina prionica.

Nessuna controindicazione all'uso delle tetracicline

Assenza di sintomi neuropsicologici, neurologici, endocrinologici e neurofisiologici riconducibili alla malattia FFI e verificati con opportune indagini cliniche nella fase di reclutamento.

Firma del consenso informato

Criteria di esclusione

Presenza di malattie renali, epatiche o cardiovascolari in fase terminale

Presenza di tumori in fase attiva

Donne in gravidanza o in allattamento

Presenza di patologie in grado di interferire con l'obiettivo della sperimentazione

Trattamento

Il farmaco (doxiciclina iclato, *Bassado*, 100 mg) in compressa e il placebo saranno preparati da azienda specializzata e resi del tutto indistinguibili alla vista all'odore e al sapore. La somministrazione della doxiciclina (solo portatori) e del placebo (non portatori) sarà effettuata in doppio cieco. Sia coloro che la riceveranno che i medici che effettueranno le analisi specialistiche non sono a conoscenza del trattamento ricevuto dai soggetti in esame.

Le preparazioni saranno prese in carico dalla farmacia dell'ASL, mantenuti in luogo secco e areato al buio, a temperatura ambiente controllata. Saranno distribuiti secondo le indicazioni del disegno dello studio in flaconi da 100 pezzi ogni tre mesi. Ogni 30 mesi saranno sintetizzati dei nuovi lotto di entrambe le preparazioni. La corretta distribuzione dei flaconi sarà sotto la responsabilità del coordinatore che utilizzerà gli opportuni accorgimenti per garantire la verifica e la sicurezza della distribuzione. Eventi associati alla terapia con doxiciclina saranno attentamente valutati al fine di stabilire l'eventuale sospensione o l'interruzione della terapia. Qualora comparissero eventi avversi nel corso della terapia il dott. Roiter e il dott. Artuso saranno disponibili 24 ore su 24 per prendere in considerazione ogni osservazione a tal proposito.

Per qualsiasi evento associato a disturbi neurologici come pure per potenziali sintomi di FFI verrà immediatamente attivata una procedura di analisi cliniche per chiarire le condizioni dei soggetti trattati.

In base alla percentuale di sopravvivenza a 11 anni di terapia si valuterà l'efficacia del trattamento preventivo. Sarà efficace per la prevenzione di FFI se non moriranno i soggetti destinati al decesso (cinque) secondo le valutazioni statistiche.

Gli eventi che possono verificarsi nel primo anno di terapia con doxiciclina non saranno presi in considerazione per l'analisi statistica dell'efficacia della terapia, dal momento che un anno è il tempo minimo perchè il farmaco sviluppi un effetto protettivo. Altri portatori man mano che giungeranno ai 41 anni saranno inclusi nello studio nel corso del quale verranno notificati tutti gli eventi significativi relativi alla terapia o alla salute dei soggetti. Ogni due anni verrà effettuata una rivalutazione clinica secondo lo stesso iniziale protocollo.

Dimensione del campione

Inizialmente saranno arruolati 11 soggetti nati dal 1958 al 1968, portatori della mutazione e 19 soggetti non portatori che riceveranno il placebo. Entreranno poi nello studio tutti coloro che man mano raggiungeranno l'età a rischio.

Valutazione clinica e esami di laboratorio

Prima dell'inizio della terapia i 30 soggetti (11 portatori e 19 non portatori) saranno sottoposti ad una valutazione clinica entro i primi 3-4 mesi di studio.

La valutazione clinica si articolerà in varie fasi: 1) valutazione medica iniziale; 2) studio endocrinologico; 3) valutazione neuropsicologica; 4) esami neurologici e neuropsicologici; 5) valutazione della funzione autonoma; 6) RMN cerebrali. La valutazione completa degli esami avverrà in un periodo di 4 mesi poichè la disponibilità degli impianti per la valutazione polisonnografica (24 ore di registrazione continua

presso l'Istituto Neurologico Carlo Besta) è limitata a sei giorni al mese. Una seconda serie di esami sarà effettuata entro il III anno dall'inizio del progetto. La prima valutazione medica seguirà le procedure standard:

- a) anamnesi
- b) esame obiettivo
- c) esami di laboratorio.

L'anamnesi e la clinica valutano lo stile di vita del paziente, eventuali malattie passate ed attuali, l'assunzione di farmaci, fattori di stress. L'esame obiettivo generale valuta lo stato di salute e indica le comuni malattie. I test di laboratorio comprenderanno: la glicemia e l'emoglobina glicosilata, Sgot, Sgpt, bilirubina totale e diretta, gamma glutamil trasferasi, fosfatasi alcalina, albumina, tempo di protrombina, creatininemi, azotemia, colesterolemia totale e Hdl, esame urine completo, trigliceridemia, protidogramma, emocromo completo, proteina c reattiva.

Endocrinologia

La FFI è caratterizzata da perdita del ritmo circadiano degli ormoni ipofisari, e della melatonina, da aumento delle catecolamine e del cortisolo, riduzione della secrezione di ACTH. Queste alterazioni sembrano la causa clinica della malattia. Assieme alle alterazioni autonome costituiscono i primi segnali di pericolo. Le indagini endocrinologiche mirano a prevedere la malattia nei portatori della mutazione FFI e costituiscono un mezzo per valutare l'asse ipotalamo ipofisario e la corretta risposta degli organi bersaglio. Per valutare la funzione ipofisaria si determinerà la secrezione basale di GH, LH, FSH, TSH, ACTH, PRL e melatonina, il cortisolo urinario delle 24 ore e l'aldosterone libero, le catecolamine e l'acido vanil mandelico. Saranno inoltre determinati i livelli plasmatici di cortisolo, FT3, FT4, testosterone libero, 17 beta estradiolo, progesterone, 17Oh progesterone, DHEA-s, l'attività dell'aldosteronemia e IGF-1. L'integrità dell'asse ipotalamo-ipofisario e la corretta risposta nella complessa rete neuroendocrina saranno determinate in base alla risposta del GH dopo GHRH+ arginina.test.

I soggetti saranno a digiuno dalla mezzanotte del giorno precedente il prelievo per gli esami ematochimici di routine e per i test endocrinologici. Alle 8.00 del mattino verranno prelevati 10 cc. di sangue. L' aldosterone e l'attività della renina plasmatica verranno determinate in clinostatismo e dopo due ore di ortostatismo. Per tre giorni consecutivi i soggetti saranno sottoposti a un esame del sangue e a raccolta delle urine delle 24 ore per la determinazione ormoni summenzionati. Le donne in menopausa o in terapia con estroprogestinici non effettueranno gli esami di LH, FSH, e degli ormoni sessuali. Le donne in età fertile saranno testate all'inizio del ciclo mestruale. Per il test GHRH+arginina per il Gh i soggetti saranno a digiuno dalla mezzanotte del giorno prima e saranno messi a letto alle 7 del mattino. La temperatura ambiente sarà mantenuta attorno ai 24-25°. Un'ora prima dei prelievi sarà presa una vena che verrà mantenuta libera con 500 cc. di soluzione fisiologica. Sempre vi sarà l'opportuna disinfezione con antisettico topico. Verrà posizionato in vena un ago, solitamente alla piega del gomito o al dorso della mano applicando un laccio emostatico per effettuare il prelievo. Dopo aver inserito delicatamente l'ago in vena lo si rimuoverà lasciando in sede la cannula. Il laccio viene poi rimosso dal braccio. Test al GHRH+arginina (GHRH 1-29; 1 mcgr/Kg IV, fino ad un massimo di 50 mcgra min 0; arginina cloridrato 0,5 g/kg dopo 30 minuti da 0 a 30 minuti, per un massimo di 30 gr). I campioni ematici saranno raccolti a -30, 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120 minuti. I campioni ematici raccolti saranno posti in

provette Vacutainer (Becton Dickinson, Rutheford, NJ, USA) per la separazione del siero, saranno centrifugati a 3000 giri per 15 min. a 4°. Il siero verrà poi congelato a -60° fino all'esecuzione del test. Tutti i campioni per ciascun ormone saranno trattati in duplice copia nel corso del test stesso. Gli ormoni saranno determinati tramite RIA, immunoluminescenza e kit di analisi HPLC.

Metodi modalità di raccolta e controllo di qualità dei dati

La raccolta dei dati sarà effettuata nelle varie fasi dello studio che si estenderà in un periodo di 11 anni. I dati saranno raccolti mediante compilazione di una scheda raccolta dati (*case report form* CRF) su supporto informatico realizzando un database via internet. La CRF contenente le informazioni di carattere clinico dei soggetti esaminati verrà compilata tramite intervista e revisione della cartella clinica, direttamente su supporto informatico in rete internet. Il controllo di qualità viene affidato al Centro di Coordinamento, che genererà le eventuali *queries* relative ai problemi di incompletezza o inconsistenza dei dati raccolti. La funzione di Centro di Coordinamento verrà affidata all'Istituto Mario Negri.

Responsabilità, coordinamento e proprietà del data base

Promotore dello studio è il Dipartimento di Neuroscienze del Mario Negri di Milano (dott. Gianluigi Forloni), che non ha alcun scopo di lucro nella sua attività, sarà proprietario del database. Il coordinamento dello studio, la raccolta dei dati e la loro analisi saranno controllati da uno *Steering Committee* Internazionale I dati saranno pubblicati con la responsabilità dello *Steering Committee* del progetto di studio Insonnia Familiare Fatale trattamento preventivo con doxiciclina di soggetti a rischio.

Aspetti di good clinical practice

Aspetti regolatori.

Lo studio prevede la somministrazione di doxiciclina 100 mg al dì per un periodo di 10 anni ai soggetti portatori di mutazione che li espone al rischio di malattia da prioni insonnia familiare fatale e somministrazione di placebo del tutto simile nell'aspetto al farmaco ai soggetti non portatori della mutazione.

Considerazioni etiche: garantita l'uniformità alle regole di Helsinki.

Rapporto rischio beneficio

I rischi sono ridotti al minimo con gli accorgimenti adottati nell'inclusione ed esclusioni dei soggetti partecipanti allo studio, e con la continua attenzione posta nell'osservare e monitorare i soggetti arruolati portatori e no.

I benefici sono facilmente intuibili per i soggetti portatori, come pure i benefici che ne deriverebbe da un'applicazione della terapia alle altre malattie prioniche in genere.

Consenso informato

E' prevista la raccolta del consenso informato che autorizzi la somministrazione del farmaco doxiciclina 100 mg/die per os ai soggetti portatori e placebo in forma del tutto simile al farmaco. Prima dell'inizio della somministrazione del farmaco o del placebo sarà pertanto richiesto il consenso informato datato e firmato dal paziente, autorizzato in accordo la normativa dei Comitati Etici dei centri partecipanti. Il consenso informato potrà essere modificato sulla base di eventuali richieste dei Comitati Etici locali.

Uso dei dati e pubblicazione dei risultati

Le analisi dei dati saranno coordinate dall'Istituto Mario Negri. Le pubblicazioni risultanti dalle analisi dei dati raccolti saranno sempre a nome dei partecipanti allo studio e nell'appendice della pubblicazione saranno riportati i referenti di ogni centro. Qualsiasi proposta di analisi sui dati raccolti potrà essere presentata dai proponenti l'analisi dopo l'approvazione dello Steering Committee dello studio. In tal caso la sequenza degli autori sarà determinata oltre che dall'accordo reciproco, da quelle che sono le usuali regole accademiche.

Timing dello studio

Settembre - Dicembre 2010 predisposizione del protocollo

Dicembre 2010 – Febbraio 2011 approvazione dello studio da parte dei comitati etici (Treviso e Milano)

Febbraio – Aprile 2011 Visite mediche e neurologiche, esami clinici e strumentali, progressivo arruolamento dei 30 soggetti.

Marzo 2011 Inizio del trattamento nei primi soggetti arruolati

Gennaio – Aprile 2013 Visite mediche e neurologiche, esami clinici e strumentali, progressivo arruolamento dei 30 soggetti.

Gennaio – Aprile 2015 Visite mediche e neurologiche, esami clinici e strumentali, progressivo arruolamento dei 30 soggetti.

Gennaio – Aprile 2017 Visite mediche e neurologiche, esami clinici e strumentali, progressivo arruolamento dei 30 soggetti.

Gennaio – Aprile 2019 Visite mediche e neurologiche, esami clinici e strumentali, progressivo arruolamento dei 30 soggetti.

Gennaio – Aprile 2021 Visite mediche e neurologiche, esami clinici e strumentali, progressivo arruolamento dei 30 soggetti. Fine del trattamento e valutazione dei risultati

Bibliografia

1. Lugaresi E, Medori R, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A, Tinuper P, Zucconi M, Gambetti P. 1986. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* 315: 997-1003.
2. Prusiner SB. 1998. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13363–13383
3. Collins SJ, Lawson VA, Masters CL. 2004. Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet* 363:51-61.
4. Young K, Piccardo P, Dlouhy S, Bugiani O, Tagliavini F, Ghetti B. 1999. The Human Genetic Prion Diseases. In: Harris DA, editor. *Prions: Molecular and Cellular Biology*. Horizon Scientific Press, pp 139-175.
5. Medori R, Tritschler HJ, LeBlanc A, Villare F, Manetto V, Chen HY, Xue R, Leal S, Montagna P, Cortelli P, et al. 1992. Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene [see comments]. *N Engl J Med* 326:444–449.
6. Monari L, Chen SG, Brown P, Parchi P, Petersen RB, Mikol J, Gray F, Cortelli P, Montagna P, Ghetti B, et al. 1994. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt–Jakob disease: different prion proteins determined by a DNA polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2839–2842.
7. Gambetti P, Parchi P, Petersen RB, Chen SG, Lugaresi E. 1995. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt–Jakob disease: clinical, pathological and molecular features. *Brain Pathology* 5:43–51.
8. Medori R, Montagna P, Tritschler HJ, LeBlanc A, Cortelli P, Tinuper P, Lugaresi E, Gambetti P. 1992. Fatal familial insomnia: a second kindred with mutation of prion protein gene at codon 178. *Neurology* 42:669–670.
9. Harder A, Gregor A, Wirth T, Kreuz F, Schulz–Schaeffer WJ, Windl O, Plotkin M, Amthauer H, Neukirch K, Kretzschmar HA, Kuhlmann T, Braas R, Hahne HH, Jendroska K. 2004. Early age of onset in fatal familial insomnia. Two novel cases and review of the literature. *J Neurol* 251:715-724.
10. Forloni G, Salmona M, Marcon G, Tagliavini F. Tetracycline and Prion infectivity *Infect Disord Drug Targets*. 9:23-30, 2009
11. Van Everbroeck B, Croes EA, Pals P, Dermaut B, Jansen G, van Duijn CM, Cruts M, VanBroeckhoven C, Martin JJ, Cras P. 2001. Influence of the prion protein and the apolipoprotein E genotype on the Creutzfeldt–Jakob Disease phenotype. *Neurosci Lett* 313: 69-72, 2001

12. Chapman J, Cervenakova L, Petersen RB, Lee HS, Estupinan J, Richardson S, Vnencak-Jones C transmissible spongiform encephalopathies. *Neurology* 51:548-553, 1998

13. Tagliavini, F., McArthur, R.A., Canciani, B., Giaccone, G., Porro, M., Bugiani, O., Lievens, M-J., Bugiani, O. Peri, E., Dall'ara, P., Rocchi, M., Poli, G., Forloni, G., Bandera, T., Varasi, M., Suarato, A., Cassuti, P., Cervini, MA., Lansen, J., Salmona, M. Post, C. Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in syrian hamsters *Science*, 276: 1119-1122, 1997

14. Tagliavini F, Forloni G, Colombo L, Rossi G, Girola L, Canciani B, Angeretti N, Giampaolo L, Peressini E, Awan T, De Gioia L, Ragg E, Bugiani O, Salmona M. Tetracycline affects abnormal properties of synthetic PrP peptides and PrP(Sc) in vitro. *J Mol Biol.* 300:1309-22 , 2000

15. Forloni G. Iussich, S. Awan T. Colombo L. Angeretti, N. Girola, L. Bertani, I. Poli, G. Caramelli, M. Bruzzone, MG. Farina, L. Limido, L. Rossi, G. Giaccone G. Ironside, JW. Bugiani, O. Salmona M. and Tagliavini, F. Tetracyclines affect prion infectivity *Proc. Natl. Acad. Sci . New York* 99: 10849-10854, 2002

16. De Luigi A, Colombo L, Diomede L, Capobianco R, Mangieri M, Miccolo C, Limido L, Forloni G, Tagliavini F, Salmona M. The efficacy of t tetracyclines in peripheral and intracerebral prion infection *PLoS ONE*. 2008 Mar 26;3(3): e1888