

REVIEW

PCSK9: DALLA CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE ALL'INIBIZIONE TERAPEUTICA

PCSK9: from the functional characterization to the therapeutic inhibition

GIANPAOLO TIBOLLA^{1,2}, GIUSEPPE DANILÒ NORATA^{1,3}, ALBERICO LUIGI CATAPANO^{1,2}

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

²IRCCS Multimedica, Milano;

³Centro per lo Studio dell'Aterosclerosi, Società Italiana Studio Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo

SUMMARY

Dyslipidemias and in particular hypercholesterolemia represent one of the major cardiovascular risk factors. Statin therapy reduces the plasma levels of low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and cardiovascular mortality, as consistently shown by clinical trials and epidemiology. Despite the efficacy of statins, in many patients at high cardiovascular risk the recommended levels of LDL-C cannot be achieved by treatment with these drugs.

The observation that proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) regulates the levels of circulating LDL-C by enhancing the degradation of the hepatic LDLR, suggested the inhibition of this protein as a possible new pharmacological treatment of hypercholesterolemia. Different approaches have been proposed: monoclonal antibodies (mAbs), that bind and block the activity of circulating PCSK9, small molecules that modulate the intracellular maturation of PCSK9 and gene silencing mediated by short interfering RNA (siRNA) and antisense oligonucleotides (ASO). The most clinically advanced approach is represented by the treatment with mAbs, that reduce plasma LDL-C levels by 70% as a mono-therapy and in combination with statins. The results of the ongoing phase III clinical trials will help in definitely addressing the impact of these drugs on the cardiovascular outcome.

Keywords: PCSK9, dyslipidemia, LDL-cholesterol

Introduzione

Le dislipidemie ed in particolare l'ipercolesterolemia rappresentano uno dei principali fattori di rischio per le malattie cardiovascolari. La terapia con statine riesce ad abbassare i livelli plasmatici di cole-

sterolo LDL (LDL-C) e a diminuire significativamente la mortalità cardiovascolare, come ampiamente dimostrato da numerosi trials clinici e da studi epidemiologici. Nonostante la documentata efficacia delle statine, in numerosi pazienti, in particolare quelli caratterizzati da un alto rischio cardiovascolare, i livelli ottimali di LDL-C, sono difficilmente raggiungibili con questa classe di farmaci e nuovi approcci terapeutici sono stati recentemente approvati, come il mipomersen che agisce

Indirizzo per la corrispondenza

Gianpaolo Tibolla

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano

Via Balzaretti, 9 - 20133 Milano

E-mail: gianpaolo.tibolla@unimi.it

silenziando l'apolipoproteina B oppure la lomitapide che inibisce l'enzima MTP (1, 2). Entrambi questi farmaci riducono sensibilmente la sintesi epatica delle lipoproteine tuttavia presentano alcune criticità che al momento ne restringono l'utilizzo principalmente in pazienti con ipercolesterolemia familiare.

Più recentemente è emerso il ruolo chiave nel metabolismo lipidico di proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) che è stata inizialmente scoperta come una proteina la cui espressione veniva indotta in neuroni cerebellari primari in seguito all'attivazione del processo di apoptosi e per questa ragione chiamata Neural Apoptosis Regulated Convertase 1 (NARC-1) (3). Successivamente sono però state descritte (4) due mutazioni nel gene codificante per PCSK9 associate con Ipercolesterolemia Autosomica Dominante (ADH).

In seguito altre mutazioni nel gene codificante per PCSK9 sono state associate con bassi livelli di colesterolo LDL (LDL-C) e ridotto rischio cardiovascolare, rivelando un ruolo importante di PCSK9 nella regolazione dei livelli di LDL-C (5). Studi di tipo funzionale hanno infatti dimostrato come PCSK9 sia in grado di regolare i livelli circolanti di LDL-C andando ad indurre nel fegato la degradazione del recettore per le LDL (LDLR). Mutazioni di PCSK9 con guadagno di funzione (gain-of-function) riducono infatti i livelli di LDLR nel fegato, aumentando così i livelli di LDL-C plasmatici ed il rischio cardiovascolare (5). Al contrario soggetti con mutazioni con perdita di funzione (loss-of-function) presentano ridotti livelli di LDL-C e protezione verso eventi cardiovascolari ischemici (5-9). Sono stati riportati anche diversi polimorfismi di PCSK9 correlati con il rischio cardiovascolare (10).

Queste osservazioni hanno stimolato un'intensa attività di ricerca su PCSK9 negli ultimi 10 anni, rendendo questa proteina uno dei più promettenti target per lo sviluppo di nuove terapie per il trattamento dell'ipercolesterolemia (11, 12).

Struttura di PCSK9

PCSK9 è una proteina di 692 aminoacidi appartenente alla famiglia delle proproteine convertasi (13), alla quale appartengono 9 serino-proteasi responsabili della maturazione proteolitica di proteine secrete, come ormoni, citochine, fattori di crescita oltre che di proteine di membrana come recettori ed integrine. Le convertasi sono caratterizzate dalla presenza di un sito attivo in grado di catalizzare l'idrolisi enzimatica di peptidi (14).

Nell'uomo il gene per PCSK9 è localizzato sul cromosoma 1p32.3, è costituito da 12 esoni e codifica per una glicoproteina di 692 aminoacidi. PCSK9 è maggiormente espressa nel fegato, nell'intestino tenue, nel rene e nel sistema nervoso centrale. PCSK9 è sintetizzata come precursore zimogeno di circa 75 KDa (pro-PCSK9). La struttura cristallina della proteina umana ha rivelato la presenza di un peptide segnale (aminoacidi 1-30), un pro-dominio (aminoacidi 31-152), un dominio catalitico e un dominio C-terminale composto da tre moduli chiamati M1, M2 e M3 caratterizzati dalla presenza di un elevato numero di residui di cisteina ed istidina (Cys e His) e da un'alta omologia strutturale con la resistina (15) (*Figura 1*).

Il precursore pro-PCSK9 subisce, a livello del reticolo endoplasmatico, un clivaggio auto-catalitico in posizione 152 con rilascio del residuo N-terminale e della proteina matura di circa 60KDa. Il taglio proteolitico del pro-dominio risulta essenziale per la maturazione della proteina, in

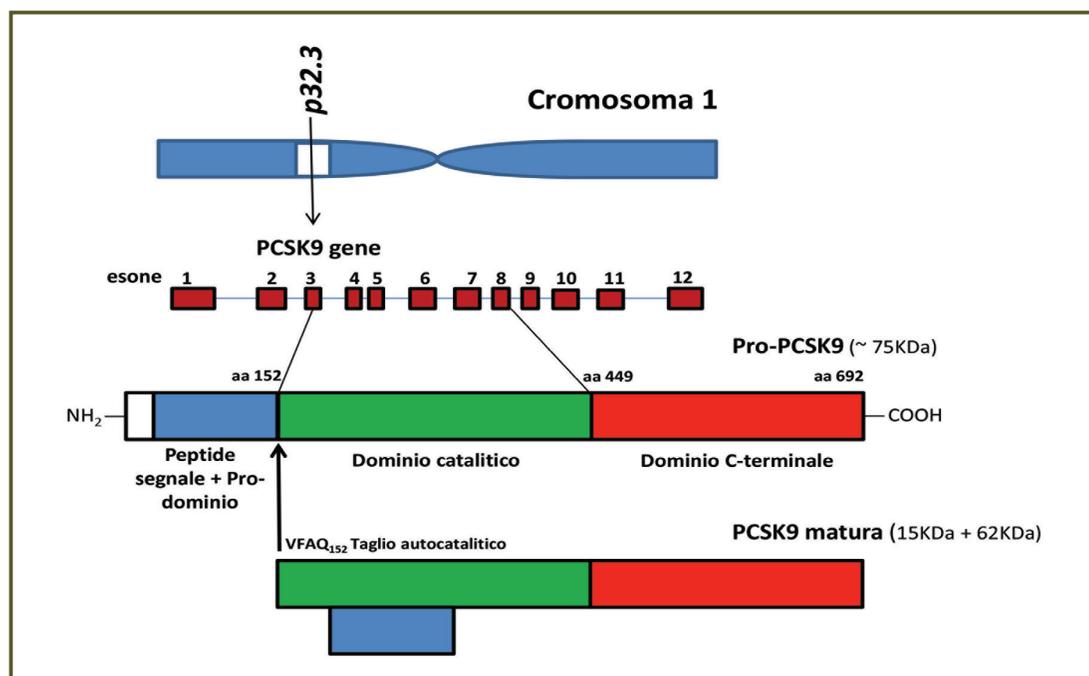


Figura 1 - Localizzazione genica e struttura proteica di PCSK9. Il gene di PCSK9 è contenuto nel cromosoma 1 in posizione p32.3, contiene 12 esoni ed ha una lunghezza totale pari a 3617 paia di basi. Il gene di PCSK9 codifica per una proteina di 692 aminoacidi comprendente un peptide segnale, un pro-dominio N-terminale, un dominio catalitico ed un dominio C-terminale. La proteina viene espressa come zimogeno inattivo che all'interno del reticolo endoplasmatico liscio va incontro ad autocatalisi a livello del residuo di Glutamina in posizione 152. L'autocatalisi di PCSK9 porta al rilascio del Pro-dominio che rimane però legato al dominio catalitico, formando un complesso che viene secreto ed è in questa forma in grado di legare e degradare LDLR.

particolare, diversamente da tutte le altre convertasi, il pro-dominio di PCSK9 rimane legato al dominio C-terminale; la formazione di questo complesso permette il movimento di PCSK9 matura attraverso il reticolo endoplasmatico e allo stesso tempo previene l'accesso di substrati al sito catalitico, inibendo così l'attività proteasica di PCSK9 (16). Anche il dominio C-terminale svolge un ruolo importante nel processo di maturazione di PCSK9, come dimostrato dalla mancata secrezione della proteina dopo delezione dei moduli M1 e M3 (17).

Dopo il rilascio, PCSK9 è presente in circolo in forma monomerica, ma può anche associarsi in omo-dimeri ed omo-

trimeri; la formazione di queste forme multimeriche, che sono associate con una maggiore capacità di degradare LDLR, è favorita dalla presenza di lipoproteine ricche in trigliceridi ed inibita da lipoproteine ad alta densità (HDL) (18). PCSK9 è presente in circolo come proteina libera e legata alle proteine plasmatiche. In seguito a separazione delle diverse frazioni lipoproteiche tramite centrifugazione su gradiente di densità è stato possibile determinare che in soggetti normo-colesterolemici circa il 30-40% di PCSK9 circolante è associato con la frazione LDL e che le LDL circolanti competono con PCSK9 per il legame con LDLR (19).

PCSK9 e metabolismo delle lipoprotei-

ne contenenti ApoB: regolazione a livello epatico del catabolismo e della produzione

Diverse evidenze sperimentali indicano che PCSK9 è in grado di legare LDLR sia a livello intracellulare che sulla superficie della membrana plasmatica degli epatociti, attraverso un meccanismo indipendente dall'attività catalitica della proteina matura (20, 21). L'espressione contemporanea del dominio di PCSK9 e di una forma inattiva dal punto di vista catalitico porta infatti ad un corretto folding e alla secrezione di una proteina in grado di riconoscere e degradare LDLR (22).

L'interazione di PCSK9 con il recettore avviene con una stechiometria di 1:1 e con una K_d di 170nM a pH neutro. L'esatto sito di legame è localizzato a livello del primo EGF-like repeat (EGF-A) presente nella porzione extracellulare del LDLR (23). Il dominio EGF-A contiene un residuo di Leucina altamente conservato (Leu318) localizzato tra due residui di Cisteina (Cys317 e Cys319) che contribuisce alla specificità del legame PCSK9-LDLR. Sono presenti anche due siti di legame per il calcio localizzati a livello del residuo N-terminale di EGF-A e all'interfaccia con EGF-B, necessari per la formazione del complesso PCSK9-LDLR e per la sua ritenzione nel lisosoma (23).

In seguito alla sua formazione a livello della membrana plasmatica, il complesso PCSK9-LDLR va incontro ad endocitosi clatrina-dipendente e, in seguito all'abbassamento del pH nell'endosoma, il residuo C-terminale di PCSK9 lega il "ligand binding domain" del recettore stabilizzando il legame tra le due proteine (24).

L'affinità di legame delle LDL per il recettore è normalmente ridotta nell'endosoma a pH acido a causa di un riarrangiamento del dominio extracellulare di LDLR necessario per il rilascio delle LDL e per il

riciclo fisiologico del recettore sulla membrana plasmatica. Il legame con PCSK9 inibisce questa modificazione conformazionale indirizzando il recettore verso il lisosoma dove viene degradato. In questo meccanismo svolge un ruolo fondamentale il dominio C-terminale di PCSK9, come dimostrato dalla perdita della capacità di degradare il recettore nella forma trunca della proteina mancante di questa porzione (24). L'interazione tra il dominio C-terminale di PCSK9 e LDLR è infatti necessaria per indirizzare il recettore all'endosoma e prevede il riconoscimento della porzione carica negativamente del ligand binding domain del recettore (25).

PCSK9 lega LDLR anche a livello intracellulare indipendentemente dall'endocitosi; infatti l'over-espressione di PCSK9 promuove la degradazione di LDLR nel reticolo endoplasmatico (25).

Studi *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che PCSK9 è in grado di degradare LDLR in epatociti, fibroblasti e macrofagi (26) ma non nella linea cellulare COS1, nel rene o nelle ghiandole surrenali. L'over-espressione *in vivo* di PCSK9 nel fegato e nel rene porta ad una riduzione dei livelli di LDLR nel fegato ma non modifica i livelli di LDLR nel rene, suggerendo che la degradazione di LDLR mediata da PCSK9 richiede fattori espressi in modo selettivo solo in alcuni tessuti (27, 28).

Queste osservazioni sono in accordo con la capacità della proteina Annexina A2 di legare il dominio C-terminale di PCSK9 e di regolarne in questo modo la funzione. È interessante notare come i livelli di Annexina A2 risultano molto bassi nel fegato rispetto ad altri tessuti, suggerendo che questa proteina possa agire come inibitore extra-epatico di PCSK9 (29).

Se l'effetto di PCSK9 nella regolazione post-traslazionale di LDLR e nella clearance delle LDL è chiaro, il suo coinvol-

gimento nella regolazione del rilascio di lipoproteine contenenti ApoB dal fegato è un aspetto discusso.

Le mutazioni di PCSK9 S127R e D374Y (con guadagno di funzione e associate con forme severe di ADH), determinano un aumento della secrezione di ApoB in epatociti in coltura e sono associate con aumentata produzione di VLDL nel topo e nell'uomo (30).

La down-regolazione di PCSK9 non altera però il rilascio di lipoproteine contenenti ApoB in epatociti in coltura, mentre l'over-espressione di PCSK9 nella sua forma wild-type nel topo determina l'aumento della secrezione di VLDL dal fegato ed un marcato aumento dei trigliceridi plasmatici a digiuno (31). Questo effetto è dipendente dalla down-regolazione di LDLR e dall'attività del recettore nucleare PPAR α .

Al contrario, è stato recentemente dimostrato che nelle cellule epatiche PCSK9 interagisce direttamente con ApoB e ne riduce la degradazione intracellulare, nel reticolo endoplasmatico, determinando l'aumento del rilascio di ApoB indipendentemente dall'attività e dai livelli di LDLR (32).

Queste evidenze suggeriscono che PCSK9 possa modulare il metabolismo delle lipoproteine contenenti ApoB attraverso meccanismi diversi da quelli coinvolti nella regolazione della clearance delle LDL e che il suo effetto dipenda dai livelli e dall'attività della proteina prevalentemente a livello intra-cellulare. Una descrizione precisa e dettagliata di questi meccanismi risulta importante in quanto l'over-produzione di ApoB100 è una delle caratteristiche associate con la dislipidemia familiare combinata (FCHL) e l'inibizione di PCSK9 potrebbe rappresentare una valida opzione terapeutica per i pazienti affetti da questa patologia.

Regolazione dell'espressione e dei livelli plasmatici di PCSK9

Il colesterolo intracellulare rappresenta il principale fattore in grado di regolare l'espressione genica di PCSK9 attraverso l'attivazione e la traslocazione nel nucleo dei fattori di trascrizione Sterol Responsive Element Binding Protein- 2 (SREBP-2) (32). L'espressione epatica di PCSK9 è infatti strettamente dipendente dal contenuto di steroli intracellulari ed è coordinata con quella di geni coinvolti nel metabolismo del colesterolo tra cui HMG-CoA sintasi, HMG-CoA reduttasi e LDLR (33, 34). Il promotore di PCSK9 contiene un sito Sp1 (specific protein 1), un sito HNF1 α (Hypoxia Nuclear Factor1 α) e due siti SRE-1 ed SRE-2 (sterol responsive elements) responsabili della regolazione da parte degli steroli dell'espressione della proteina. La repressione della trascrizione del gene di PCSK9 indotta dagli steroli è anche mediata dal reclutamento del cofattore TRRAP (transformation/transactivation domain-associated protein) sul sito di riconoscimento HINFP (histone nuclear factor P), localizzato tra il sito HNF1 α e il primo sito SRE-1, il quale agisce come cofattore facilitando l'acetilazione del promotore (35). Il sito HNF1 α coopera con il sito SRE-1 nella regolazione della trascrizione del gene di PCSK9 ed è responsabile della down-regolazione indotta dalla berberina (36).

A livello post-trascrizionale risulta essere importante nel determinare i livelli e l'attività di PCSK9, il ruolo svolto da proteasi come la furina o la PC5/6A, le quali tagliano la PCSK9 matura a livello del residuo Arg218 e determinano il rilascio di una forma tronca di PCSK9 di circa 55 kDa. L'attività di questa forma della proteina è ancora poco chiara, anche se studi in epatociti in coltura ed in topi con dele-

zione epatica della furina sembrano suggerire una diminuita capacità della forma tronca di PCSK9 di degradare LDLR. In accordo con questa osservazione in soggetti portatori delle mutazioni F216L e R218S nel gene codificante per la furina si ha una diminuita attività proteolitica di questa convertasi con una maggiore attività di PCSK9 che porta ad ipercolesterolemia (37) (*Figura 2*).

La concentrazione plasmatica di PCSK9 riscontrata nella popolazione generale è molto variabile con livelli che compresi fra 20-30 ng/ml e 10 µg/ml. Queste differenze sono probabilmente dovute oltre che alla effettiva variabilità biologica delle popolazioni in cui è stata effettuata la misurazione, anche da problemi metodologici in relazione all' utilizzo di saggi ELISA con anticorpi con diversa specificità di legame.

Data l'importanza fisio-patologica dell'attività della proteina, misurare i livelli plasmatici di PCSK9 nella popolazione generale ed in pazienti sotto trattamento farmacologico o caratterizzati da elevato rischio cardiovascolare risulta di notevole rilevanza. Questo è dimostrato dalla recente osservazione che i livelli di PCSK9 circolanti predicono la ricorrenza di eventi clinici in pazienti con coronaropatia stabile trattati con basse dosi di atorvastatina (38).

Il concetto chiave risulta essere che le variazioni dei livelli e dalla biosintesi endogena di colesterolo nel tessuto epatico sono i principali fattori che regolano l'espressione di PCSK9 e risultano essere quindi anche il maggiore determinante dei livelli circolanti della proteina (39). Come conseguenza la produzione di PCSK9 è stimolata dalla deplezione di

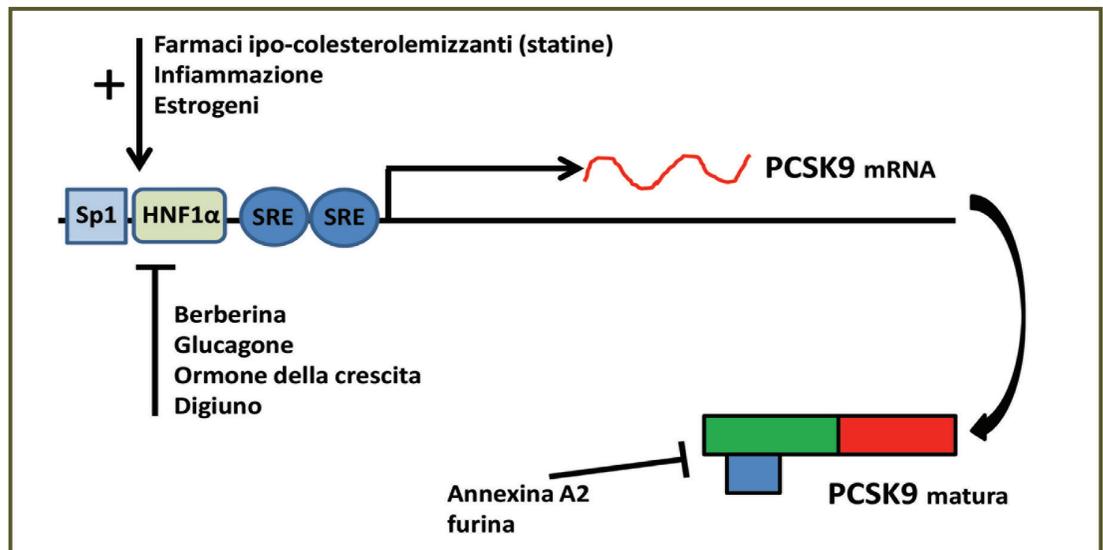


Figura 2 - zRegolazione trascrizionale e post-trascrizionale di PCSK9. Il promotore del gene codificante per PCSK9 contiene diversi elementi tra cui un sito Sp1, un sito HNF1 e due elementi responsivi al contenuto di steroli intracellulari. La trascrizione del gene è quindi regolata in modo complesso ed è estremamente sensibile alla variazione dei livelli ed alla biosintesi endogena del colesterolo a livello epatico. Il principale stimolo in grado di indurre la trascrizione è quindi la bassa disponibilità di colesterolo intracellulare. Una volta processata e secreta nella sua forma matura PCSK9 può essere regolata negativamente a livello post-trascrizionale, in particolare può andare incontro a proteolisi mediata dalla furina o ad inibizione da parte di Annexina A2, proteina altamente espressa in tessuti extra-epatici.

colesterolo nell'epatocita indotta da trattamenti farmacologici ipocolesterolemizzanti come le statine (40).

Come atteso dalla fisiologia della proteina, è stata anche descritta in modo consistente in numerosi studi una correlazione positiva tra i livelli circolanti di PCSK9 e i livelli di LDL-C, anche se i livelli di PCSK9 nelle popolazioni arruolate nel Dallas Heart Study e nel trial clinico JUPITER spiegano rispettivamente solo il 7% e il 2,25% della variazione di LDL-C (41, 42). Questa correlazione positiva è ridotta o completamente persa durante il trattamento con statine, che in modo dose-dipendente, aumentano i livelli di PCSK9 nel plasma, un effetto che diminuisce l'efficacia di questi farmaci di abbassare i livelli di LDL-C (52). L'effetto dei fibrati sui livelli e sull'attività di PCSK9 è invece meno chiaro e sia una diminuzione che un aumento dei livelli circolanti di PCSK9 sono stati descritti in pazienti trattati con questa classe di farmaci ipolipidemizzanti (43-45). In un'analisi di un sottogruppo di pazienti appartenenti al trial clinico FIELD (Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes) study è stata inizialmente trovata una moderata riduzione della concentrazione di PCSK9 (8%) in pazienti diabetici trattati per 6 settimane con fenofibrati (200 mg/giorno) (43).

Lo stesso gruppo di ricerca ha osservato che il fenofibrato (145 mg/giorno) riduce i livelli di PCSK9 plasmatici del 13% in un piccolo gruppo di pazienti con diabete di tipo 2 già trattati con statine e che la riduzione dei livelli di PCSK9 correla positivamente con la riduzione delle VLDL plasmatiche (46).

In contrasto con questi risultati altri gruppi indipendenti hanno riportato che i fibrati aumentano i livelli di PCSK9 anche in pazienti diabetici (47). In pazienti con dislipidemia aterogena, il trattamento con

fenofibrati (200 mg/giorno) determina un aumento del 25% di PCSK9 circolante (45). L'ezetimibe è un farmaco ipocolesterolemizzante che riduce l'assorbimento intestinale di colesterolo. Il trattamento con questo farmaco in combinazione con statine è associata con un aumento significativo di PCSK9 nel plasma comparato con pazienti trattati solo con statine (48). Non risulta però esserci un effetto significativo del trattamento in monoterapia con ezetimibe sui livelli di PCSK9 plasmatici (41).

Anche lo stato nutrizionale e ormonale possono influenzare i livelli di PCSK9 circolanti che sono fortemente ridotti dal glucagone, dall'ormone della crescita e durante il digiuno (49). I livelli di PCSK9 risultano aumentati nelle donne adulte nel periodo pre-menopausa mentre sono più alti nei maschi durante la pubertà suggerendo un possibile effetto degli ormoni sessuali sull'espressione di PCSK9.

Espressione ed attività extra-epatica di PCSK9

La generazione di topi PCSK9 knockout ha rivelato che il fegato è allo stesso tempo il tessuto che regola i livelli di PCSK9 nel plasma e il principale target dell'attività della proteina. Nonostante il ruolo centrale svolto dal fegato, altri tessuti sono in grado di sintetizzare PCSK9, in particolare il rene, l'intestino tenue, il pancreas endocrino e il sistema nervoso centrale (26). L'attività di PCSK9 non è inoltre ristretta alla degradazione di LDLR ma contribuisce alla regolazione di recettori come VLDLR e ApoER2, modulando così importanti funzioni cellulari dove queste proteine sono espresse (tessuto adiposo, muscolo cardiaco, macrofagi e cellule tumorali) (*Figura 3*). In studi di espressione genica in cellule epatiche è stato

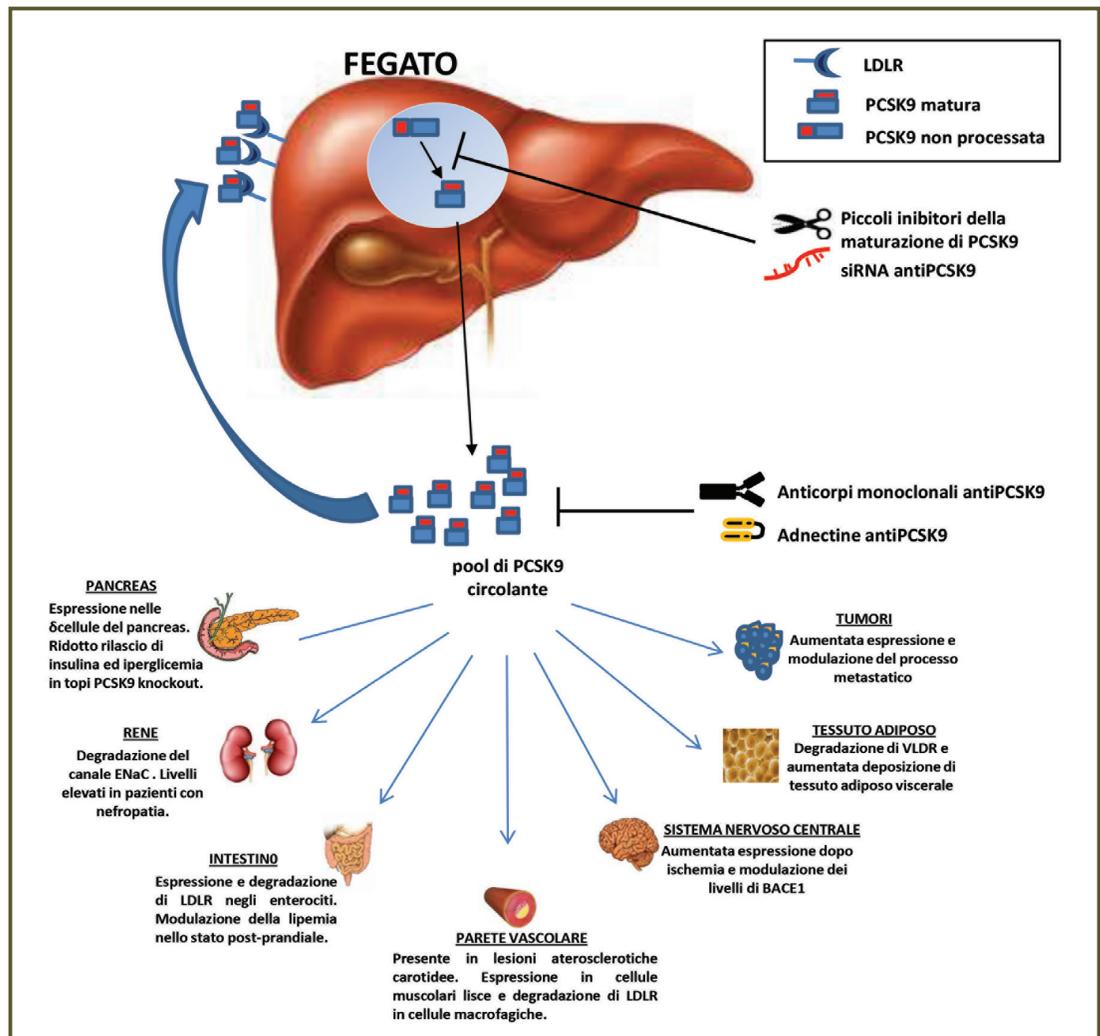


Figura 3 - Fisiologia ed inibizione terapeutica di PCSK9. PCSK9 è espressa prevalentemente nel fegato dove viene sintetizzata e rilasciata in circolo come proteina funzionale in grado di legare LDLR e di mediare la degradazione. PCSK9 circolante o prodotto localmente regola importanti funzioni in diversi tessuti oltre al fegato, come tumori, tessuto adiposo viscerale, sistema nervoso centrale, vasi arteriosi, intestino, pancreas e rene. Sono inoltre raffigurati i 4 principali approcci utilizzati correntemente per l'inibizione della proteina: short interfering RNA (siRNA) e piccoli inibitori della maturazione di PCSK9 agiscono a livello intracellulare, riducendo la sintesi o il rilascio di PCSK9 in circolo, mentre anticorpi monoclonali e adnectine bloccano l'attività della proteina circolante.

poi dimostrato che l'over-espressione di PCSK9 regola non solo geni coinvolti nel metabolismo del colesterolo ma anche di quelli coinvolti in importanti processi cellulari come la proliferazione, l'apoptosi e l'infiammazione (50).

È stato dimostrato che PCSK9 ha un ef-

fetto pro-apoptotico nei neuroni cerebellari in seguito alla degradazione di ApoER2 (51). L'espressione di PCSK9 è anche indotta in seguito ad ischemia cerebrale nel topo, anche se l'assenza di PCSK9 non determina differenze nell'estensione della lesione a livello del parenchima

cerebrale (52). È stata inoltre ipotizzata anche un'azione diretta di PCSK9 sull'enzima BACE1 (β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1) responsabile della formazione del peptide β -amiloide, il principale costituente delle placche caratteristiche della malattia di Alzheimer, anche se nel topo PCSK9 knockout non si osservano alterati livelli né di BACE1 né del peptide β -amiloide (27, 53). Le cellule dell'epitelio intestinale esprimono PCSK9 che è in grado di degradare LDLR a livello della membrana baso-laterale modulando così l'omeostasi del colesterolo e il metabolismo dei chilomicroni. Inoltre nella linea cellulare Caco 2-15 trattata con PCSK9 esogeno si assiste ad una riduzione dei livelli di LDLR accompagnata da aumento dell'uptake di colesterolo dalla superficie luminale, oltre che della sintesi e del rilascio di lipoproteine contenenti ApoB48 (54). Nel topo PCSK9 knockout si osserva un migliorato profilo lipidico post-prandiale in seguito a somministrazione di un bolo di olio d'oliva, con una riduzione significativa dei trigliceridi plasmatici, riduzione che si ipotizza essere causata da una ridotta secrezione di ApoB intestinale oltre che dall'aumentata capacità di rimozione dei chilomicroni dal circolo (55).

PCSK9 è espresso nell'uomo anche a livello del pancreas endocrino, in particolare nelle cellule δ .

Nel topo PCSK9 altera la funzione del pancreas endocrino, infatti la carenza della proteina è stata associata ad anomalie morfologiche delle isole di Langerhans e provoca dopo i cinque mesi di vita una riduzione della secrezione d'insulina ed iperglicemia (56, 57).

Gli adipociti non esprimono PCSK9 ma presentano alti livelli LDLR e VLDLR. Quest'ultimo, gioca un ruolo fondamentale nel legame e nella successiva idroli-

si delle lipoproteine ricche in trigliceridi, passaggio chiave nell'accumulo degli acidi grassi nel tessuto adiposo. Nel topo si è osservato che PCSK9 circolante regola negativamente i livelli di VLDLR nel tessuto adiposo e di conseguenza topi PCSK9 Knockout mostrano aumentati livelli di VLDLR e all'età di sei mesi mostrano un aumento dell'80% della massa di tessuto adiposo viscerale rispetto a topi controllo (58).

Recentemente è stata anche riportata la presenza di PCSK9 in lesioni aterosclerotiche carotidee.

Tra i diversi tipi cellulari presenti a livello della placca aterosclerotica le cellule muscolari lisce sembrano essere quelle che contribuiscono maggiormente alla produzione di PCSK9. In queste cellule PCSK9 è metabolizzato e secreto in modo simile a quanto avviene negli epatociti ed è capace di indurre la degradazione di LDLR nei macrofagi e di regolare in questo modo il legame e l'uptake di lipoproteine aterogene (26).

Queste scoperte suggeriscono la possibilità che PCSK9, sia di origine vascolare che epatica, possa modulare la composizione cellulare della lesione aterosclerotica. A questo proposito è stato recentemente dimostrato che la mancanza di PCSK9 riduce l'aterosclerosi e l'accumulo a livello aortico di esteri del colesterolo in topi apolipoproteina E Knockout ma non in animali privi di LDLR (59).

Infine PCSK9 risulta essere up-regolata in un modello animale di carcinoma colon-rettile ed in molti tessuti tumorali umani come nel cancro cervicale, nell'adenocarcinoma esofageo e nel carcinoma renale. L'espressione di PCSK9 risulta invece essere ridotta nel tumore alla prostata e della mammella, suggerendo un ruolo di PCSK9 nella progressione di specifici tipi di tumore (60).

Approcci terapeutici per l'inibizione di PCSK9

Il meccanismo d'azione delle statine si basa sull'aumento dell'espressione negli epatociti di LDLR in seguito alla deplezione intracellulare di colesterolo indotta dall'inibizione dell'enzima HMGCoA reductasi. Come già descritto in precedenza in parallelo all'espressione di LDLR viene anche attivata l'espressione di PCSK9 che diminuisce significativamente l'efficacia del trattamento con statine. Queste osservazioni, insieme alla descrizione di soggetti sani con livelli circolanti di PCSK9 molto bassi o addirittura assenti, hanno suggerito che l'inibizione di PCSK9 possa essere un valido approccio terapeutico complementare alla statina nel trattamento dell'ipercolesterolemia. Gli inibitori di PCSK9 possono essere divisi in due categorie: quelli che agiscono a livello intracellulare andando ad inibire la sintesi o il processo di maturazione della proteina e quelli in grado di bloccare l'interazione con il recettore a livello extra-cellulare. Della prima categoria fanno parte ASO e siRNA, che inducono la degradazione dell'RNA messaggero codificante per PCSK9, e piccole molecole in grado di bloccare il processo di maturazione e rilascio della proteina. Nella seconda categoria si trovano invece peptidi e molecole in grado di inibire la formazione del complesso PCSK9-LDLR sulla membrana plasmatica e gli anticorpi monoclonali (mAbs) in grado di legare PCSK9 circolante bloccandone l'attività, questi ultimi rappresentano le molecole in stato di sperimentazione clinica più avanzato.

Anticorpi monoclonali

Almeno 6 diversi mAbs contro PCSK9 sono in sviluppo clinico: Alirocumab

(SAR236553/REGN727), Evolocumab (AMG145), RN316/PF-04950615, RG7652, 1B20 e LGT209. Tra questi il maggior numero di dati disponibili riguarda Alirocumab (61-64) e Evolocumab (61, 65-68).

Studi pre-clinici

Studi pre-clinici in topi hanno mostrato che una singola somministrazione endovenosa di Evolocumab raddoppia i livelli di LDLR nel fegato e diminuisce i livelli di colesterolo totale circolanti fino al 36%, mentre in scimmie cynomolgus lo stesso anticorpo riduce i livelli di LDL-C fino all'80%, un effetto che permane per 10 giorni (69). L'anticorpo 1B20 è in grado di legare PCSK9 umano, murino, di ratto con alta affinità (1.3, 4.5 e 1 nM rispettivamente). Una singola somministrazione endovenosa di 1B20 ad una dose di 1.1 mg/Kg in topi CETP/LDLR +/- diminuisce i livelli di LDL-C del 29% a distanza di 48 ore.

Dosi più alte di 3 e 10 mg/Kg, con somministrazioni ripetute per 14 giorni si sono dimostrate più efficaci nello stesso modello murino con riduzioni dei livelli di LDL-C rispettivamente del 50 e del 70%. 1B20 è stato infine testato in un modello animale di scimmia con sindrome metabolica in mono-terapia o in combinazione con simvastatina, mostrando una riduzione significativamente maggiore dei livelli di LDL-C in seguito alla combinazione dei due farmaci rispetto all'utilizzo in monoterapia, sottolineando l'utilità dell'inibizione di PCSK9 durante la terapia con statina (70).

Studi clinici di fase I

I risultati dei trials clinici di fase I con mAbs contro PCSK9 sono stati incoraggianti. Il trattamento con Alirocumab iniettato sottocute in soggetti sani con

livelli di LDL-C superiori a 100mg/dL porta ad una riduzione media dei livelli di LDL-C pari al 65%, un effetto che alla dose più alta viene mantenuto fino a 30 giorni dalla somministrazione. Anche in pazienti ipercolesterolemici, sottoposti a restrizioni dietetiche ma non a trattamento farmacologico ipolipidemizzante, il trattamento con Alirocumab ha portato ad una riduzione dei livelli di LDL-C pari al 57% (71).

In pazienti sottoposti a terapia con statina, sia affetti da ipercolesterolemia di natura non genetica che pazienti affetti da ADH, l'associazione con Alirocumab porta rispettivamente ad un'ulteriore riduzione dei livelli di LDL-C del 38-65% e del 41-58% (62).

Una singola somministrazione dell'anticorpo Evolocumab per via sottocutanea o endovenosa in soggetti sani con livelli di LDL-C tra 100 e 200 mg/dL porta ad una riduzione dei livelli di LDL-C fino al 64%. Evolocumab è stato anche testato in soggetti con livelli di LDL-C compresi tra 70 e 200 mg/dL in combinazione con statine. Evolocumab ha in questo caso dimostrato la capacità di ridurre il livello di LDL-C in modo dose dipendente fino ad una riduzione massima del 75% rispetto ai valori iniziali (61). Studi clinici di fase I con RN316/PF-04950615 sono stati recentemente conclusi (<http://clinicaltrials.gov/show/NCT00991159>).

In tutti gli studi di fase I sopra descritti i mAbs sono stati ben tollerati, sia dopo singola somministrazione che dopo somministrazioni ripetute. Nella maggior parte dei casi gli eventi avversi riportati sono stati la comparsa di emicrania e, nel caso specifico della posologia sottocutanea, reazioni nel sito di somministrazione di natura per lo più lieve e transitoria. Questi eventi avversi non hanno mostrato però una frequenza significativamente maggiore nei gruppi trattati con mAbs e non

hanno portato in nessun caso all'uscita dei soggetti dallo studio.

Studi clinici di fase II

Studi di fase II con Alirocumab e Evolocumab sono stati completati nel 2012 ed hanno confermato gli incoraggianti risultati ottenuti negli studi clinici di fase I (*Tabella 1*). Il trattamento con Alirocumab è stato testato su pazienti affetti da ipercolesterolemia in terapia con atorvastatina a diverse dosi (10, 20 e 40 e 80 mg) ed in pazienti ADH eterozigoti in terapia con statina ed ezetimibe (62-64). In pazienti con ipercolesterolemia primaria Alirocumab 50-300 mg dopo 12 settimane di trattamento abbassa i livelli di LDL-C del 40-72% indipendentemente dalla dose di atorvastatina.

Il trattamento di pazienti in terapia con atorvastatina al dosaggio di 80 mg con una somministrazione sottocutanea di Alirocumab ogni 2 settimane ha mostrato dopo 8 settimane una riduzione dei livelli di LDL-C pari al 72% rispetto ad una riduzione del 18% ottenuta con il trattamento con la sola statina. In pazienti con ADH eterozigoti il trattamento con Alirocumab è stato testato a dosi diverse di 150, 200 e 300 mg con somministrazione ogni 4 settimane e ad una dose di 150 mg con somministrazione ogni 2 settimane contro placebo.

Il trattamento ha portato ad una riduzione dose dipendente dei livelli di LDL-C variabile dal 28,9% al 67,9%. Studi clinici di fase II con Evolocumab hanno mostrato risultati simili in combinazione con dosi massimali di statina ed anche in monoterapia, in soggetti ipercolesterolemici, inclusi pazienti ADH eterozigoti, ed in pazienti intolleranti alle statine (65-68).

Sono stati recentemente presentati i risultati di studi clinici di fase II con RN316/PF-04950615. Il farmaco è stato testato su

Tabella I - Effetto dell'inibizione di PCSK9 con Alirocumab, Evolocumab e RN316/PF-04950615 negli studi clinici di fase II.

Tipologia di pazienti arruolati	Studio	Terapia ipolipidizzante	Dosi e durata del trattamento	Livelli di partenza di LDL-C (mg/dL)	Variazione (%) dei livelli di LDL-C
Pazienti con ipercolesterolemia (LDL-C 100-190mg/dL)	MENDEL ^o	nessuna	Da 70 a 480 mg s.c. ogni 2 o 4 settimane per 12 settimane	143	Da -41 a -51
Pazienti ad alto rischio cardiovascolare ed intolleranti alle statine	GAUSS ^o	+/- ezetimibe	Da 280 a 480 mg s.c. ogni 4 settimane per 12 settimane	193	Da -41 a -63
Pazienti con ipercolesterolemia LDL-C ≥100 mg/dL	NCT01288443 [*]	Statina	Da 50 a 300 mg s.c. ogni 2 o 4 settimane per 12 settimane	~125	Da -40 a -72
Pazienti con ADH eterozigoti	NCT01266876 [*]	Statina +/- ezetimibe	Da 150 a 300 mg s.c. ogni 2 o 4 settimane per 12 settimane	~152	Da -29 a -68
Pazienti con ADH eterozigoti	RUTHERFORD ^o	Statina +/- ezetimibe	da 350 a 480 mg s.c. ogni 4 settimane per 12 settimane	156	Da -43 a -55
Pazienti con ipercolesterolemia (LDL-C ≥85 mg/dL)	LAPLACE-TIMI 57 ^o	Statina	Da 70 a 480 mg s.c. ogni 2 o 4 settimane per 12 settimane	146	Da -42 a -66
Pazienti con ipercolesterolemia (LDL-C ≥80 mg/dL) In terapia con la massima dose tollerata di statina	NCT01342211 NCT01350141 §	Statina	Da 0.25 a 6 mg/kg i.v. ogni 4 settimane per 12 settimane	~122	Da -13 a -56

Abbreviazioni ADH, ipercolesterolemia autosomica dominante; s.c. somministrazione sottocutanea. *Studio in cui è stato utilizzato Alirocumab; ^oStudio in cui è stato utilizzato Evolocumab; §Studio in cui è stato utilizzato RN316.

pazienti ipercolesterolemici non in grado di raggiungere i livelli desiderati di LDL-C con il trattamento con statine alle massime dosi tollerate. Dopo 12 settimane di trattamento si è osservata una riduzione dei livelli di LDL-C pari al 60%. Tre pazienti non hanno terminato lo studio per l'insorgere di gravi eventi avversi (depressione, dolore all'addome e dolore al petto non di natura anginoso).

Nel complesso i risultati mostrano che l'utilizzo di mAbs porta ad una riduzione media dei livelli colesterolo pari al 50-60% sia in mono-terapia che quando somministrati in combinazione con una statina. La posologia migliore sembra essere quella di due somministrazioni sottocutanee

al mese, che permettono una maggiore stabilità nella riduzione della colesterolemia ed evitano i picchi di LDL-C che si presentano nel caso di somministrazioni a distanza di un mese. Assumendo un beneficio, che come dimostrato da numerosi studi epidemiologici e meta-analisi, è proporzionale alla riduzione dei livelli di LDL-C il trattamento con mAbs potrebbe portare ad una riduzione del 40-50% del rischio cardiovascolare relativo. Nella pratica clinica l'utilizzo di questi farmaci potrebbe essere inizialmente limitato a soggetti affetti da ADH eterozigoti oltre che a pazienti che presentano intolleranza alle statine.

Per quanto riguarda il possibile utilizzo

di mAbs contro PCSK9 in pazienti ADH omozigoti, il trattamento con Evolocumab si è dimostrato efficace in misura molto variabile e probabilmente dipendente dalla natura della mutazione del gene LDLR e da quanto questa influisce sull'espressione e sull'attività del recettore (72).

Sono in corso o sono stati annunciati studi clinici di fase III con mAbs contro PCSK9, i risultati di questi studi di lunga durata ed effettuati in popolazioni numerose saranno essenziali per definire l'effettiva capacità di queste molecole nel ridurre il rischio e la mortalità cardiovascolare. I recenti risultati dello studio OSLER (Open-label Study of Long-Term Evaluation Against LDL-C Randomized trial) sono in questo senso incoraggianti (73).

In questo trial i pazienti con ipercolesterolemia, precedentemente trattati con Evolocumab negli studi di fase II sopra descritti, sono stati mantenuti in terapia con Evolocumab 420 mg ogni 4 settimane in combinazione con terapia ipolipidizzante, oppure riportati alla sola terapia ipolipidizzante, e quindi monitorati per 52 settimane.

I risultati mostrano un'efficacia prolungata di Evolocumab, associata con una buona tollerabilità. Nei pazienti in trattamento con Evolocumab è stata infatti mantenuta una riduzione dei livelli di LDL-C pari al 52.1%, simile a quella ottenuta negli studi di fase II, mentre nei pazienti riportati alla sola terapia ipolipidizzante i valori di LDL-C sono ritornati ai valori basali osservati al momento dell'arruolamento negli studi di fase II.

Non è stata inoltre riscontrata nessuna differenza tra i due gruppi nell'incidenza di gravi eventi avversi (7,1% vs 6.3% nei pazienti in terapia con Evolocumab e in sola terapia ipolipidizzante rispettivamente).

Silenziamento genico

Oligonucleotidi antisense e short interfering RNA (siRNA) sono in grado di indurre la degradazione dell'mRNA di PCSK9, portando così all'inibizione dell'espressione della proteina. Queste molecole offrono quindi la possibilità di bloccare l'attività di PCSK9 anche a livello intracellulare. ASO e siRNA hanno poi una farmacocinetica che è caratterizzata da una distribuzione prevalente nei tessuti epatici e sono quindi particolarmente utili per modulare in modo estremamente specifico l'espressione di proteine epatiche come nel caso di PCSK9.

L'inibizione di PCSK9 con ASO è in grado di diminuire significativamente l'espressione ed i livelli plasmatici di PCSK9 e di ridurre i livelli di colesterolo in topi ipercolesterolemici (74). Una singola dose endovenosa di siRNA è in grado di ridurre il colesterolo plasmatico in ratti e topi transgenici over-esprimenti PCSK9 umano, senza alterare il contenuto di trigliceridi nel fegato. Nelle scimmie, in seguito ad una singola iniezione endovenosa si osserva una riduzione di circa il 60% di LDL-C che permane fino a 3 settimane (75). Lo sviluppo clinico di ASO BMS-PCSK9RX e di LNA SPC50001 è stato terminato durante gli studi di fase I per ragioni che non sono state chiarite. Sono stati invece recentemente pubblicati i dati di uno studio clinico di fase I con ALN-PCS, un siRNA in grado di degradare in modo specifico l'mRNA codificante per PCSK9 e formulato con nano-particelle di natura lipidica (76). Il trattamento con ALN-PCS in volontari sani alle dosi di 0.015, 0.045, 0.090, 0.150, 0.250 e 0.400 mg/kg si è dimostrato ben tollerato, con assenza di gravi eventi avversi ed un effetto dose dipendente nel ridurre i livelli di LDL-C con la massima riduzione (-40%) ottenuta alla dose di 0,4

mg/kg in frado di abbassare i livelli plasmatici di PCSK9 del 70%.

Conclusioni

La storia di PCSK9 rappresenta un classico esempio di come un approccio integrato da un punto di vista genetico, biochimico e clinico porti all'identificazione di nuovi target farmacologici. Il rapido sviluppo e il grande interesse in questa area di ricerca ha portato a definire in breve tempo l'inibizione dell'attività di PCSK9 come uno dei nuovi approcci terapeutici più promettenti per la terapia delle ipercolesterolemie. Nonostante i grandi passi in avanti fatti nella caratterizzazione della proteina e nello sviluppo di farmaci in grado di inibirla, ci sono molti punti che nel futuro andranno presi in dovuta considerazione, tra questi:

1. Il trattamento con inibitori di PCSK9

può plausibilmente portare al raggiungimento di livelli di LDL-C estremamente bassi; tuttavia la ricerca clinica dovrà attentamente valutare come questa situazione sia sempre priva di rischi per l'organismo.

2. Il ruolo fisiologico di PCSK9, in particolare in tessuti extra-epatici come cervello e rene, non è stato del tutto chiarito. Approcci terapeutici in grado di bloccare oltre alla proteina circolante anche quella intracellulare prodotta al di fuori del fegato dovranno essere valutati con attenzione riguardo a sicurezza ed efficacia.
3. Gli anticorpi monoclonali si sono dimostrati uno strumento terapeutico efficace nel trattamento dell'ipercolesterolemia; tuttavia la loro sicurezza, in particolare riguardo ad una possibile attivazione del sistema immunitario, deve essere ancora completamente provata.

Glossario

Proproteina convertasi: Le proproteina convertasi sono proteine conservate nei mammiferi con omologia alle subtilasi batteriche. Sono serina-proteasi che vengono secrete e sono in grado di attivare o inibire tramite proteolisi numerosi substrati intracellulari e presenti a livello della membrana plasmatica.

Furina: La furina è un enzima appartenente alla famiglia delle proproteina convertasi che catalizza la proteolisi di numerose proteine tra le quali PCSK9.

LDL-C: Il colesterolo LDL è la frazione di colesterolo circolante trasportato dalle lipoproteine a bassa densità (LDL), caratterizzate da una densità compresa tra 1.019g/L <math>< 8</math> g/L) e dalla presenza di apolipoproteina B100.

Ipercolesterolemia autosomica dominante (ADH): L'ipercolesterolemia

autosomica dominante è una malattia genetica caratterizzata da elevati livelli plasmatici di LDL-C e da mortalità cardiovascolare precoce. I geni coinvolti fino ad ora identificati sono quello codificante per il recettore delle LDL (LDLR) (ADH-1, ~67% dei casi), quello codificante per l'apolipoproteina B100, che funge da ligando per LDLR (ADH-2, ~14% dei casi) e quello codificante per PCSK9 (ADH-3, ~2% dei casi). Mutazioni in un solo allele di questi geni sono sufficienti a causare la patologia.

Sterol response element binding proteins (SREBPs): SREBPs sono fattori di trascrizione legati alle membrane intracellulari che subiscono un processo di proteolisi a livello del Golgi, attivato dalla deplezione di steroli, in seguito alla quale viene rilasciato un frammento citosolico NH₂-terminale. Questo frammento migra nel nucleo dove riconoscendo

specifiche sequenze denominate sterol responsive element (SRE) media la trascrizione di geni coinvolti nel metabolismo del colesterolo e degli acidi grassi.

Anticorpi monoclonali (mAbs): Gli anticorpi monoclonali sono anticorpi tra loro identici in quanto prodotti da un singolo clone cellulare, in grado di legare specificamente un unico epitopo all'interno di un antigene. In campo terapeutico gli mAbs possono essere nudi o coniugati con farmaci o isotopi radioattivi.

Short interfering RNA (siRNA): Gli siRNA sono molecole di RNA a doppio filamento lunghe tra le 20 e le 25 paia di basi in grado di mediare il silenziamento genico tramite riconoscimento

altamente specifico, guidato dalle regole di appiamento tra basi azotate, e successiva degradazione di un RNA messaggero target.

Oligonucleotidi antisenso (ASO): Gli oligonucleotidi antisenso sono brevi molecole a singolo filamento di DNA o RNA di una lunghezza media intorno ai 20 nucleotidi. Gli ASO presentano sequenze complementari ad una specifica molecola di mRNA di cui viene bloccata la traduzione attraverso due meccanismi principali: l'attivazione di enzimi in grado di idrolizzare l'RNA target come le RNasi ed il blocco della traduzione a livello del ribosoma, attraverso la formazione di un doppio filamento sull'mRNA in via di traduzione.

RIASSUNTO

Le dislipidemie ed in particolare l'ipercolesterolemia rappresentano uno dei principali fattori di rischio per le malattie cardiovascolari. La terapia con statine riesce ad abbassare i livelli plasmatici di colesterolo LDL (LDL-C) e a diminuire significativamente la mortalità cardiovascolare, come ampiamente dimostrato da numerosi trials clinici e da studi epidemiologici.

Nonostante la documentata efficacia delle statine, in numerosi pazienti, in particolare quelli caratterizzati da un alto rischio cardiovascolare, i livelli ottimali di LDL-C, sono difficilmente raggiungibili con questa classe di farmaci. L'osservazione che la proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) è in grado di regolare i livelli di LDL-C degradando i recettori per le LDL (LDLR) a livello epatico ha suggerito lo sviluppo di inibitori di questa proteina per il trattamento delle ipercolesterolemie. Diversi approcci sono stati fino ad ora proposti tra cui anticorpi monoclonali in grado di legare PCSK9 circolante e di bloccarne l'attività, piccole molecole in grado di interferire con la maturazione intracellulare di PCSK9 e silenziamento genico mediato da short interfering RNA (siRNA) o oligonucleotidi antisenso (ASO).

Attualmente l'approccio più avanzato da un punto di vista clinico è rappresentato dagli anticorpi monoclonali, che sono in grado di abbassare i livelli di LDL-C fino al 70% in mono-terapia ed in aggiunta alla terapia con statine. I risultati dei trials clinici di fase III che sono ora in corso saranno di fondamentale importanza per definire con sicurezza l'efficacia di questi farmaci nella riduzione del rischio cardiovascolare.

Parole chiave: *PCSK9, LDL colesterolo, dislipidemia.*

Bibliografia

1. Norata GD, Ballantyne CM, Catapano AL. New therapeutic principles in dyslipidaemia: focus on LDL and Lp(a) lowering drugs. *Eur Heart J*. 2013; 34(24): 1783-9.
2. Norata GD, Tibolla G, Catapano AL. Gene silencing approaches for the management of dyslipidaemia. *Trends in pharmacological sciences*. 2013; 34(4): 198-205.
3. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1):

- liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(3): 928-33.
4. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*. 2003; 34(2): 154-6.
 5. Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, Hobbs HH. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet*. 2005; 37(2): 161-5.
 6. Berge KE, Ose L, Leren TP. Missense mutations in the PCSK9 gene are associated with hypocholesterolemia and possibly increased response to statin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26(5): 1094-100.
 7. Kotowski IK, Pertsemlidis A, Luke A, Cooper RS, Vega GL, Cohen JC, et al. A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Hum Genet*. 2006; 78(3): 410-22.
 8. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Jr., Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *The New England journal of medicine*. 2006; 354(12): 1264-72.
 9. Zhao Z, Tuakli-Wosornu Y, Lagace TA, Kinch L, Grishin NV, Horton JD, et al. Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *Am J Hum Genet*. 2006; 79(3): 514-23.
 10. Norata GD, Garlaschelli K, Grigore L, Raskell S, Tramontana S, Meneghetti F, et al. Effects of PCSK9 variants on common carotid artery intima media thickness and relation to ApoE alleles. *Atherosclerosis*. 2010; 208(1): 177-82.
 11. Tibolla G, Norata GD, Artali R, Meneghetti F, Catapano AL. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): from structure-function relation to therapeutic inhibition. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2011; 21(11): 835-43.
 12. Norata GD, Tibolla G, Catapano AL. Targeting PCSK9 for Hypercholesterolemia. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2013.
 13. Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, Mayne J, Wickham L, Jin W, et al. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem*. 2004; 279(47): 48865-75.
 14. Seidah NG. The proprotein convertases, 20 years later. *Methods Mol Biol*. 2011; 768: 23-57.
 15. Hampton EN, Knuth MW, Li J, Harris JL, Lesley SA, Spraggon G. The self-inhibited structure of full-length PCSK9 at 1.9 Å reveals structural homology with resistin within the C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 ; 104(37): 14604-9.
 16. Cunningham D, Danley DE, Geoghegan KF, Griffor MC, Hawkins JL, Subashi TA, et al. Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol*. 2007; 14(5): 413-9.
 17. Du F, Hui Y, Zhang M, Linton MF, Fazio S, Fan D. Novel domain interaction regulates secretion of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) protein. *J Biol Chem*. 2011; 286(50): 43054-61. PubMed PMID: 22027821.
 18. Fan D, Yancey PG, Qiu S, Ding L, Weeber EJ, Linton MF, et al. Self-association of human PCSK9 correlates with its LDLR-degrading activity. *Biochemistry*. 2008; 47(6): 1631-9.
 19. Kosenko T, Golder M, Leblond G, Weng W, Lagace TA. Low density lipoprotein binds to proprotein convertase subtilisin/kexin type-9 (PCSK9) in human plasma and inhibits PCSK9-mediated low density lipoprotein receptor degradation. *The Journal of biological chemistry*. 2013; 288(12): 8279-88.
 20. Qian YW, Schmidt RJ, Zhang Y, Chu S, Lin A, Wang H, et al. Secreted PCSK9 down-regulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis. *J Lipid Res*. 2007; 48(7): 1488-98.
 21. Nassoury N, Blasiolo DA, Tebon Oler A, Benjannet S, Hamelin J, Poupon V, et al. The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR. *Traffic*. 2007; 8(6): 718-32.
 22. McNutt MC, Lagace TA, Horton JD. Cata-

- lytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. *J Biol Chem.* 2007; 282(29): 20799-803.
23. Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, McDonald M, Horton JD, et al. Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *The Journal of biological chemistry.* 2007; 282(25): 18602-12.
 24. Yamamoto T, Lu C, Ryan RO. A two-step binding model of PCSK9 interaction with the low density lipoprotein receptor. *The Journal of biological chemistry.* 2011; 286(7): 5464-70.
 25. Holla OL, Cameron J, Tveten K, Strom TB, Berge KE, Laerdahl JK, et al. Role of the C-terminal domain of PCSK9 in degradation of the LDL receptors. *J Lipid Res.* 2011; 52(10): 1787-94.
 26. Ferri N, Tibolla G, Pirillo A, Cipollone F, Mezzetti A, Pacia S, et al. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) secreted by cultured smooth muscle cells reduces macrophages LDLR levels. *Atherosclerosis.* 2012; 220(2): 381-6.
 27. Liu M, Wu G, Baysarowich J, Kavana M, Adona GH, Bierilo KK, et al. PCSK9 is not involved in the degradation of LDL receptors and BACE1 in the adult mouse brain. *J Lipid Res.* 2010; 51(9): 2611-8.
 28. Luo Y, Warren L, Xia D, Jensen H, Sand T, Petras S, et al. Function and distribution of circulating human PCSK9 expressed extra-hepatically in transgenic mice. *J Lipid Res.* 2009; 50(8): 1581-8.
 29. Mayer G, Poirier S, Seidah NG. Annexin A2 is a C-terminal PCSK9-binding protein that regulates endogenous low density lipoprotein receptor levels. *J Biol Chem.* 2008; 283(46): 31791-801.
 30. Herbert B, Patel D, Waddington SN, Eden ER, McAleenan A, Sun XM, et al. Increased secretion of lipoproteins in transgenic mice expressing human D374Y PCSK9 under physiological genetic control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 ; 30(7): 1333-9.
 31. Lambert G, Jarnoux AL, Pineau T, Pape O, Chetiveaux M, Laboisie C, et al. Fasting induces hyperlipidemia in mice overexpressing proprotein convertase subtilisin kexin type 9: lack of modulation of very-low-density lipoprotein hepatic output by the low-density lipoprotein receptor. *Endocrinology.* 2006; 147(10): 4985-95.
 32. Sun H, Samarghandi A, Zhang N, Yao Z, Xiong M, Teng BB. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 interacts with apolipoprotein B and prevents its intracellular degradation, irrespective of the low-density lipoprotein receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32(7): 1585-95.
 33. Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, et al. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(21): 12027-32.
 34. Maxwell KN, Soccio RE, Duncan EM, Sehayek E, Breslow JL. Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *J Lipid Res.* 2003; 44(11): 2109-19.
 35. Li H, Liu J. The novel function of HINFP as a co-activator in sterol-regulated transcription of PCSK9 in HepG2 cells. *Biochem J.* 2012; 443(3): 757-68.
 36. Li H, Dong B, Park SW, Lee HS, Chen W, Liu J. Hepatocyte nuclear factor 1alpha plays a critical role in PCSK9 gene transcription and regulation by the natural hypocholesterolemic compound berberine. *J Biol Chem.* 2009; 284(42): 28885-95.
 37. Essalmani R, Susan-Resiga D, Chamberland A, Abifadel M, Cremers JW, Boileau C, et al. In vivo evidence that furin from hepatocytes inactivates PCSK9. *J Biol Chem.* 2011.
 38. Huijgen R, Boekholdt SM, Arsenault BJ, Bao W, Davaine JM, Tabet F, et al. Plasma PCSK9 levels and clinical outcomes in the TNT (Treating to New Targets) trial: a nested case-control study. *J Am Coll Cardiol.* 2012 May 15;59(20):1778-84. PubMed PMID: 22575316. Epub 2012/05/12. eng.
 39. Persson L, Cao G, Stahle L, Sjoberg BG, Troutt JS, Konrad RJ, et al. Circulating proprotein convertase subtilisin kexin type 9 has a diurnal rhythm synchronous with cho-

- lesterol synthesis and is reduced by fasting in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30(12): 2666-72.
40. Welder G, Zineh I, Pacanowski MA, Troutt JS, Cao G, Konrad RJ. High-dose atorvastatin causes a rapid sustained increase in human serum PCSK9 and disrupts its correlation with LDL cholesterol. *J Lipid Res.* 2010; 51(9): 2714-21.
 41. Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(7): 2537-43.
 42. Awan Z, Seidah NG, MacFadyen JG, Benjannet S, Chasman DI, Ridker PM, et al. Rosuvastatin, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 concentrations, and LDL cholesterol response: the JUPITER trial. *Clinical chemistry.* 2012; 58(1): 183-9.
 43. Lambert G, Ancellin N, Charlton F, Comas D, Pilot J, Keech A, et al. Plasma PCSK9 concentrations correlate with LDL and total cholesterol in diabetic patients and are decreased by fenofibrate treatment. *Clin Chem.* 2008; 54(6): 1038-45.
 44. Costet P, Cariou B, Lambert G, Lalanne F, Lardeux B, Jarnoux AL, et al. Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem.* 2006; 281(10): 6211-8.
 45. Troutt JS, Alborn WE, Cao G, Konrad RJ. Fenofibrate treatment increases human serum proprotein convertase subtilisin kexin type 9 levels. *J Lipid Res.* 2010; 51(2): 345-51.
 46. Chan DC, Hamilton SJ, Rye KA, Chew GT, Jenkins AJ, Lambert G, et al. Fenofibrate concomitantly decreases serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and very-low-density lipoprotein particle concentrations in statin-treated type 2 diabetic patients. *Diabetes, obesity & metabolism.* 2010 Sep; 12(9): 752-6.
 47. Mayne J, Dewpura T, Raymond A, Cousins M, Chaplin A, Lahey KA, et al. Plasma PCSK9 levels are significantly modified by statins and fibrates in humans. *Lipids in health and disease.* 2008; 7: 22.
 48. Dubuc G, Tremblay M, Pare G, Jacques H, Hamelin J, Benjannet S, et al. A new method for measurement of total plasma PCSK9: clinical applications. *J Lipid Res.* 2010; 51(1): 140-9.
 49. Browning JD, Horton JD. Fasting reduces plasma proprotein convertase, subtilisin/kexin type 9 and cholesterol biosynthesis in humans. *J Lipid Res.* 2010; 51(11): 3359-63.
 50. Lan H, Pang L, Smith MM, Levitan D, Ding W, Liu L, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) affects gene expression pathways beyond cholesterol metabolism in liver cells. *J Cell Physiol.* 2010; 224(1): 273-81.
 51. Kysenius K, Muggalla P, Matlik K, Arumae U, Huttunen HJ. PCSK9 regulates neuronal apoptosis by adjusting ApoER2 levels and signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2012; 69(11): 903-16.
 52. Rousselet E, Marcinkiewicz J, Kriz J, Zhou A, Hatten ME, Prat A, et al. PCSK9 reduces the protein levels of the LDL receptor in mouse brain during development and after ischemic stroke. *J Lipid Res.* 2011; 52(7): 1383-91.
 53. Jonas MC, Costantini C, Puglielli L. PCSK9 is required for the disposal of non-acetylated intermediates of the nascent membrane protein BACE1. *EMBO reports.* 2008; 9(9): 916-22.
 54. Levy E, Ben Djoudi Ouadda A, Spahis S, Sane AT, Garofalo C, Grenier E, et al. PCSK9 plays a significant role in cholesterol homeostasis and lipid transport in intestinal epithelial cells. *Atherosclerosis.* 2013; 227(2): 297-306.
 55. Le May C, Kourimate S, Langhi C, Chetiveaux M, Jarry A, Comera C, et al. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29(5): 684-90.
 56. Langhi C, Le May C, Kourimate S, Caron S, Staels B, Krempf M, et al. Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes. *FEBS Lett.* 2008; 582(6): 949-55.
 57. Mbikay M, Sirois F, Mayne J, Wang GS, Chen A, Dewpura T, et al. PCSK9-deficient mice exhibit impaired glucose tolerance and pancreatic islet abnormalities. *FEBS letters.* 2010; 584(4): 701-6.

58. Roubtsova A, Munkonda MN, Awan Z, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Lazure C, et al. Circulating proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) regulates VLDL protein and triglyceride accumulation in visceral adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31(4): 785-91.
59. Denis M, Marcinkiewicz J, Zaid A, Gauthier D, Poirier S, Lazure C, et al. Gene inactivation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces atherosclerosis in mice. *Circulation.* 2012; 125(7): 894-901.
60. Sun X, Essalmani R, Day R, Khatib AM, Seidah NG, Prat A. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 deficiency reduces melanoma metastasis in liver. *Neoplasia.* 2012; 14(12): 1122-31.
61. Dias CS, Shaywitz AJ, Wasserman SM, Smith BP, Gao B, Stolman DS, et al. Effects of AMG 145 on low-density lipoprotein cholesterol levels: results from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose phase 1 studies in healthy volunteers and hypercholesterolemic subjects on statins. *Journal of the American College of Cardiology.* 2012; 60(19): 1888-98.
62. McKenney JM, Koren MJ, Kereiakes DJ, Hanotin C, Ferrand AC, Stein EA. Safety and efficacy of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease, SAR236553/REGN727, in patients with primary hypercholesterolemia receiving ongoing stable atorvastatin therapy. *Journal of the American College of Cardiology.* 2012; 59(25): 2344-53.
63. Stein EA, Gipe D, Bergeron J, Gaudet D, Weiss R, Dufour R, et al. Effect of a monoclonal antibody to PCSK9, REGN727/SAR236553, to reduce low-density lipoprotein cholesterol in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia on stable statin dose with or without ezetimibe therapy: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet.* 2012; 380(9836): 29-36.
64. Roth EM, McKenney JM, Hanotin C, Asset G, Stein EA. Atorvastatin with or without an antibody to PCSK9 in primary hypercholesterolemia. *The New England journal of medicine.* 2012; 367(20): 1891-900.
65. Giugliano RP, Desai NR, Kohli P, Rogers WJ, Somaratne R, Huang F, et al. Efficacy, safety, and tolerability of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in combination with a statin in patients with hypercholesterolaemia (LAPLACE-TIMI 57): a randomised, placebo-controlled, dose-ranging, phase 2 study. *Lancet.* 2012; 380(9858): 2007-17.
66. Koren MJ, Scott R, Kim JB, Knusel B, Liu T, Lei L, et al. Efficacy, safety, and tolerability of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 as monotherapy in patients with hypercholesterolaemia (MENDEL): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet.* 2012; 380(9858): 1995-2006.
67. Raal F, Scott R, Somaratne R, Bridges I, Li G, Wasserman SM, et al. Low-density lipoprotein cholesterol-lowering effects of AMG 145, a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia: the Reduction of LDL-C with PCSK9 Inhibition in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia Disorder (RUTHERFORD) randomized trial. *Circulation.* 2012; 126(20): 2408-17.
68. Sullivan D, Olsson AG, Scott R, Kim JB, Xue A, GebSKI V, et al. Effect of a monoclonal antibody to PCSK9 on low-density lipoprotein cholesterol levels in statin-intolerant patients: the GAUSS randomized trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 2012; 308(23): 2497-506.
69. Chan JC, Piper DE, Cao Q, Liu D, King C, Wang W, et al. A proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 neutralizing antibody reduces serum cholesterol in mice and non-human primates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106(24): 9820-5.
70. Ni YG, Di Marco S, Condra JH, Peterson LB, Wang W, Wang F, et al. A PCSK9-binding antibody that structurally mimics the EGF(A) domain of LDL-receptor reduces LDL cholesterol in vivo. *J Lipid Res.* 2011; 52(1): 78-86.
71. Stein EA, Mellis S, Yancopoulos GD, Stahl N, Logan D, Smith WB, et al. Effect of a monoclonal antibody to PCSK9 on LDL cholesterol. *The New England journal of medicine.* 2012; 366(12): 1108-18.

72. Stein EA, Honarpour N, Wasserman SM, Xu F, Scott R, Raal FJ. Effect of the Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9 Monoclonal Antibody, AMG 145, in Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *Circulation*. 2013; 128(19): 2113-20.
73. Koren MJ, Giugliano RP, Raal FJ, Sullivan D, Bolognese M, Langslet G, et al. Efficacy and Safety of Longer-Term Administration of Evolocumab (AMG 145) in Patients With Hypercholesterolemia: 52-Week Results From the Open-Label Study of Long-Term Evaluation Against LDL-C (OSLER) Randomized Trial. *Circulation*. 2013.
74. Graham MJ, Lemonidis KM, Whipple CP, Subramaniam A, Monia BP, Crooke ST, et al. Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. *J Lipid Res*. 2007; 48(4): 763-7.
75. Frank-Kamenetsky M, Grefhorst A, Anderson NN, Racie TS, Bramlage B, Akinc A, et al. Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(33): 11915-20.
76. Fitzgerald K, Frank-Kamenetsky M, Shulgamorskaya S, Liebow A, Bettencourt BR, Sutherland JE, et al. Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind.