

FATTORI DI PROTEZIONE

LIVELLI MOLTO BASSI DI LDL E RISCHIO CARDIOVASCOLARE: DALLE EVIDENZE GENETICHE A QUELLE DEI TRIAL CLINICI

Very low levels of LDL and cardiovascular risk: from genetic to clinical trial evidence

PATRIZIA TARUGI¹, DAVIDE NOTO²¹Dipartimento Scienze della Vita, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena;²Dipartimento Biomedico di Medicina Clinica e Specialistica (DIBIMIS),
Università degli Studi di Palermo**SUMMARY**

Cardiovascular disease (CV) is still the main cause of mortality and morbidity in both industrialized and developing populations. For this reason the pharmaceutical industry has continued to develop new molecules capable of achieving more ambitious goals in order to prevent the greatest number of CV events. Among these molecules the anti proconvertase-subtilisin-kexin 9 monoclonal antibodies (anti-PCSK9-Mab) have been shown to be able to reach very low levels of LDL-C (even lower than 20 mg/dL) in addition to conventional therapy. The anti-PCSK9 Mab allowed to clarify some controversial aspects in the context of lipid-lowering therapy. In addition to clarifying that reducing the LDL-C to extremely low levels continues to reduce the CV risk, they have also clarified how the reduction in CV risk is obtained by reducing the LDL-C with any strategy and not for particular "pleiotropic" effects of drugs. However, the extremely low levels of LDL-C reached in the trials have caused concern, in the hypothesis that they are pathological levels. In fact, there are genetic models of hypocholesterolemia that we can use to assess which clinical risks we run to maintain extremely low levels of LDL-C throughout life, and in particular there is a model of PCSK9 deficiency that exactly mimics the therapeutic effect of Anti-PCSK9-Mab. The purpose of this review is to illustrate the effect of Mabs on CV risk reduction and to predict what the long-term effects of this continuous therapy might be by describing the models of low cholesterol genetic syndromes.

Keywords: *Monoclonal anti-PCSK9, hypobetalipoproteinemia type 1, hypobetalipoproteinemia type 2, cardiovascular risk, clinical trials.*

Introduzione

La malattia cardiovascolare rappresenta ancora oggi la principale causa di mortalità in tutto il mondo. Nonostante i primi trial con statine, risalenti a più di due

Indirizzo per la corrispondenza

Patrizia Tarugi, Davide Noto
Università di Modena e di Palermo
E-mail: patriziamaria.tarugi@unimore.it
notoddd@gmail.com

decadi fa (1-3), abbiano dimostrato che la riduzione dei livelli di colesterolo comporta la riduzione degli eventi cardiovascolari (CV), ad oggi rimane una notevole quota di pazienti che sviluppano eventi CV anche nel contesto dei trials controllati. Una delle evidenze scaturite in questi venti anni è che la riduzione farmacologica dei livelli di colesterolo continua a mostrare benefici in termini di risparmio di eventi anche per valori considerati bassi (4). Questi nuovi obiettivi di LDL-C sono diventati talmente importanti nella prevenzione CV (5) da determinare la nascita di una serie di nuove molecole in grado di raggiungere livelli di LDL-C fino ad oggi proibitivi per le molecole convenzionali. Gli anticorpi monoclonali anti proconvertasi-subtilisina-kexina 9 (anti-PCSK9-Mab) sono sicuramente i nuovi farmaci che hanno avuto maggiore successo. Attualmente in Italia sono disponibili due prodotti, Alirocumab (6) ed Evolocumab (7), mentre il Bocsizumab non ha superato i trials di fase III (8). Entrambe le molecole hanno iniziato la fase di commercializzazione in Italia ed è divenuto subito evidente come tale terapia, in aggiunta alla terapia convenzionale, abbia premesso di raggiungere livelli

di LDL-C mai raggiunti prima, anche al di sotto dei 20 mg/dL. Esiste una serie di quesiti che la comunità scientifica si pone alla luce di tali risultati, tra i quali se realmente esistano benefici ulteriori nel raggiungere livelli così bassi di LDL-C, se tali livelli siano sicuri per l'organismo umano e se sia possibile prevedere quali siano gli effetti collaterali collegati a questa nuova patologia. Per rispondere a questi quesiti è possibile prendere in considerazione il modello delle sindromi genetiche a basso colesterolo (SGBC).

Le SGBC comprendono un gruppo eterogeneo di disordini monogenici caratterizzati da bassi livelli plasmatici di colesterolo totale (CT) e di alcune classi di lipoproteine deputate al trasporto dei lipidi di origine endogena (VLDL e LDL) ed esogena (Chilomicroni). Queste lipoproteine sono denominate lipoproteine contenenti apoB poiché la loro principale componente proteica strutturale è l'apolipoproteina B (apoB) (9). Le VLDL, sintetizzate nel fegato, e le LDL, prodotto del loro catabolismo intravascolare, contengono apoB-100, una proteina di 4.536 aminoacidi. I chilomicroni (CM) contengono apoB-48 (una proteina di 2.152 aminoacidi corrispondente al 48% amino-terminale dell'apoB-100) che viene sintetizzata nell'intestino. ApoB-100 e apoB-48 sono codificate dallo stesso gene (gene APOB) (9, 10). L'assemblaggio di CM e VLDL avviene, rispettivamente nell'intestino e nel fegato, a livello ribosomiale durante la sintesi di apoB (evento co-traduzionale): mentre la regione COOH-terminale si sta sintetizzando, la regione NH-terminale viene traslocata nel lume del reticolo endoplasmatico (RE) dove avviene l'assemblaggio con i lipidi. La lipidizzazione dell'apoB nascente, cioè il trasferimento di lipidi neutri dalle membrane del RE alla molecola di apoB nascente, richiede

Bullet Points

- I trial clinici con anti-PCSK9 Mab hanno dimostrato l'efficacia e la sicurezza della terapia di inibizione del PCSK9 con Mab.
- Gli anti-PCSK9 Mab si sono dimostrati un efficace trattamento ipolipemizzante in pazienti ad alto rischio cardiovascolare consentendo di raggiungere livelli di LDL-C molto bassi (<20 mg/dL) e riduzione di eventi cardiovascolari.
- Gli anti-PCSK9 Mab non hanno mostrato effetti collaterali rilevanti a medio e lungo termine.
- Alcuni disordini monogenici con fenotipo "basso colesterolo" mostrano come livelli molto bassi di LDL-C, mantenuti per tutta la vita, sono associati ad una netta riduzione del rischio cardiovascolare.

l'intervento della proteina MTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein), una molecola "chaperone" presente nel lume del RE sia degli epatociti che degli enterociti (10). L'MTP interagisce con la regione NH-terminale dell'apoB nascente formando un dominio in grado di reclutare i lipidi e iniziare l'assemblaggio della particella lipoproteica. L'interazione tra MTP e apoB è necessaria non solo per il processo di lipidizzazione ma anche per la corretta e completa traslocazione dell'apoB nascente nel lume del RE e per il mantenimento del corretto "folding" dell'apoB. La lipidizzazione iniziale porta alla formazione di particelle lipoproteiche primordiali parzialmente lipidate. L'MTP promuove anche la mobilizzazione di vescicole ricche in trigliceridi (TG) dalla membrana del RE liscio verso il lume del reticolo stesso dove costituiscono le "vescicole lipidiche del lume". Nel lume del RE, le lipoproteine primordiali si fondono con le "vescicole lipidiche del lume" per essere trasferite all'apparato di Golgi dove acquisiscono una maggior quantità di lipidi, apoAI ed ApoA-II formando delle lipoproteine mature destinate alla secrezione (11-13). Il trasporto vescicolare intracellulare di CM e VLDL nella via secretoria è mediato dal complesso COPII (Coat Protein Complex II). Una subunità proteica fondamentale di questo complesso è la proteina SAR1B, GTPasi responsabile della formazione delle vescicole grazie al reclutamento di componenti del complesso COPII (Sec 23, Sec 24, Sec13/Sec31). La proteina SAR1B è essenziale per il trasporto vescicolare dei CM nell'enterocita (11) ma sembra avere un ruolo anche nella secrezione epatica delle VLDL (13). Nelle SGBC i ridotti livelli plasmatici di CT sono generalmente dovuti alla ridotta concentrazione delle LDL dato che due terzi del colesterolo plasmatico sono trasportati da

Le Ipobetalipoproteinemie possono inquadrarsi in due categorie:

- 1) Ipobetalipoproteinemie secondarie cioè dovute ad un'alterazione metabolica in corso di svariate condizioni patologiche (quali ad es. malnutrizione, ipertiroidismo, epatopatie gravi, malattie infettive, neoplasie).
- 2) Ipobetalipoproteinemie primitive, disordini primari del metabolismo dovuti a cause genetiche. Possono essere monogeniche (cioè dovute a difetti di un singolo gene) ovvero poligeniche dovute al concorso di più difetti genici in combinazione con eventuali fattori ambientali.

queste lipoproteine; in molti casi ciò è associato anche ad una riduzione dei livelli di VLDL. Ridotti livelli di VLDL e LDL si esprimono con ridotti livelli di apoB definendo un profilo lipidico noto come ipobetalipoproteinemia (HBL) (*Box 1*). Ridotti livelli di CT possono essere anche dovuti ad una combinazione di bassi livelli di LDL associati a bassi livelli HDL, quindi una riduzione sia di apoB che di apoA-I, quadro noto come ipolipemia combinata. Dal punto di vista fisiopatologico le HBL primitive si distinguono in due categorie: HBL dovute a difetto di secrezione delle lipoproteine contenenti apoB da parte del fegato e/o dell'intestino e HBL dovute ad aumentato catabolismo epatico di queste lipoproteine conseguente ad una aumentata cattura da parte del fegato (9).

Lo scopo principale di questa review è quello di rivisitare il meccanismo di azione, i risultati ottenuti dalla sperimentazione clinica degli anti-PCSK9-Mab, e di confrontare questi dati con i modelli genetici di SGBC allo scopo di comprendere se livelli estremamente bassi di LDL-C siano efficaci nel ridurre la malattia CV. In questa trattazione verranno anche considerati brevemente i possibili effetti collaterali a medio-lungo termine, anche alla luce dei dati clinici scaturiti dalla rivisitazione della letteratura pubblicata sui casi di SGBC.

Le Ipocolesterolemie primitive

Ipobetalipoproteinemia familiare tipo 1 da mutazioni del gene APOB

L'Ipobetalipoproteinemia familiare tipo 1 (FHBL-1, OMIM# 615558) è la principale forma di HBL monogenica a trasmissione dominante (9, 14, 15). Nel 50% dei casi FHBL-1 è dovuta a mutazioni del gene APOB che si traducono in difetti di assemblaggio e secrezione di lipoproteine contenenti apoB (15). La maggior parte dei soggetti FHBL-1 sono portatori eterozigoti di varianti patogenetiche "nonsense" e "frameshift" del gene APOB che interferiscono con la traduzione completa dell'mRNA codificante l'apoB, determinando la formazione di forme troncate di apoB (9, 14). Le apoB troncate hanno dimensioni variabili a seconda della localizzazione della mutazione nel gene APOB e vengono denominate secondo una nomenclatura in centili rispetto all'apoB-100 (es. apoB-20 cioè corrispondente al 20% dell'apoB-100). Le apoB troncate hanno una ridotta capacità di legare i lipidi per formare lipoproteine mature destinate alla secrezione da parte del fegato e/o intestino. Le apoB troncate di dimensioni inferiori ad apoB-29/30 non vengono secrete né dal fegato

né dall'intestino come costituenti di VLDL e CM. Quando le mutazioni del gene APOB producono apoB troncate più lunghe dell'apoB-48 il difetto di secrezione è confinato al fegato; il difetto di secrezione di VLDL da parte del fegato è responsabile della steatosi epatica che si riscontra frequentemente in questi pazienti (9). Quando le forme troncate sono più corte dell'apoB-48, il difetto di secrezione interessa sia la produzione epatica di VLDL che di CM nell'intestino. Fino ad ora sono state riportate in letteratura solo alcune mutazioni del gene APOB che determinano la sostituzione di singoli amminoacidi come causa di FHBL-1. Queste mutazioni "missenso" (A31P, R463W, L343V, R505W) comportano una degradazione intracellulare dell'apoB mutata interferendo con la capacità dell'apoB di formare lipoproteine (16-19). Nei soggetti FHBL-1, il difetto di secrezione di lipoproteine contenenti apoB comporta una ridotta secrezione di lipidi in circolo (diminuzione dei livelli plasmatici di VLDL, LDL e talvolta CM) con conseguente loro accumulo nelle cellule (epatociti e/o enterociti). La principale manifestazione clinica dell'FHBL-1 eterozigote è infatti una steatosi epatica di gravità variabile (*Tabella 1*) (9, 20). Meno

Tabella 1 - Caratteristiche cliniche delle principali ipocolesterolemie primitive dominanti.

	FHBL-1 da difetto di APOB	FHBL-1 da difetto di PCSK9	FHBL-2
Diabete mellito	NO	NO	NO
CVD	NO	NO	NO
Colelitiasi	SI	NO	NO
Steatosi epatica	SI	NO	NO
Cirrosi	SI	NO	NO
Epatocarcinoma	SI	NO	NO
Malassorbimento intestinale di lipidi	SI ¹	NO	NO

Nota: ¹FHBL-1 omozigoti/eterozigoti-composti per mutazioni che determinano apoB troncate di dimensioni inferiori ad apoB-48; FHBL-1 eterozigoti per apoB troncate di dimensioni inferiori ad apoB-48 e mutazioni "missenso", dopo un test da carico orale di grassi.

frequentemente è presente steatosi intestinale che si può presentare nei portatori di apoB troncate di dimensioni inferiori ad apoB-48 e di alcune mutazioni “missenso”; in questo caso i pazienti possono presentare, oltre a steatosi epatica, intolleranza ai grassi alimentari, e talvolta steatorrea moderata e malassorbimento intestinale in particolare dopo un pasto ricco in grassi (9, 15, 17). Il fenotipo clinico nei soggetti portatori di due alleli mutanti (omozigoti ed eterozigoti-composti) è molto più severo e variabile a seconda della troncatura dell'apoB. Soggetti omozigoti per forme troncate di apoB più corte dell'apoB-48, a causa della incapacità di formare CM nell'intestino, presentano, oltre alla steatosi epatica, diarrea, malassorbimento intestinale di lipidi (con conseguente ritardo di crescita e deficit di vitamine liposolubili) e complicanze a lungo termine come retinite pigmentosa e disfunzioni neurologiche (9, 21, 22). Il profilo lipidico nei soggetti FHBL-1 eterozigoti presenta una marcata riduzione dei livelli di CT, LDL-C ed apoB (~30% dei valori normali) mentre negli omozigoti i livelli di LDL-C ed apoB sono molto ridotti o indosabili (9, 15).

Ipoβetaliipoproteinemia familiare tipo 1 da mutazioni del gene PCSK9

In una minoranza di casi (circa il 2%) FHBL-1 è dovuta a mutazioni con perdita di funzione (LOF) del gene PCSK9 che determinano un aumentato catabolismo epatico delle lipoproteine contenenti apoB conseguente ad un maggiore “uptake” recettore-mediato delle LDL (9). La proteina PCSK9 fa parte della famiglia del PCSK, ma presenta caratteristiche peculiari non condivise con gli altri membri della famiglia, come la presenza di un dominio di tipo “annexin-like” all'estremo COOH-terminale (23) che le conferisce proprietà particolari. La proteina PCSK9 svolge un ruolo

fondamentale nel controllo del contenuto intracellulare di colesterolo regolando a livello epatico il numero dei recettori LDL (LDL-R) disponibili sulla superficie cellulare (24). Nel fegato, in condizioni di bassi livelli di colesterolo intracellulare, viene stimolata la trascrizione (SRBP-mediata) del gene PCSK9, che porta alla produzione della proteina PCSK9. La proteina PCSK9 matura viene secreta dagli epatociti e sulla superficie cellulare lega il recettore LDL (LDL-R). Il complesso PCSK9-Recettore LDL viene internalizzato ed il recettore indirizzato ai lisosomi per la degradazione anziché riciclare sulla membrana cellulare (24, 25). Mutazioni LOF del gene PCSK9, che inattivano la proteina PCSK9, sono associate ad un aumento del numero di LDL-R sulla membrana plasmatica degli epatociti. La mancata sintesi o il blocco del trasporto intracellulare di PCSK9, impedisce la secrezione della proteina che non è in grado di interagire con i LDL-R e quindi promuovere la loro degradazione lisosomiale. Di conseguenza si verifica un aumento del numero di recettori esposti a cui consegue un maggiore “uptake” di LDL. L'aumentata clearance delle LDL plasmatiche determina un fenotipo lipidico caratterizzato da bassi livelli di LDL, cioè un fenotipo HBL, simile a quello riscontrato nella FHBL-1 dovuta a mutazione del gene APOB (9, 26).

Nel 2005, in una popolazione multietnica, Cohen et al. (26) hanno identificato le prime due mutazioni LOF di PCSK9 (p.Y142X and p.C679X) in soggetti con ipocolesterolemia, prevalentemente di origine Afro-Americana. Altre mutazioni con effetto patogenetico sono poi state descritte in un paziente ipocolesterolemico Giapponese (p.W428X) (27), in una famiglia Italiana e in una coorte di soggetti con livelli di CT inferiori al 5° percentile della popolazione (p.A68fsL82X) (28). I portato-

ri eterozigoti di queste mutazioni “nonsense” presentavano una riduzione dei livelli di LDL-C variabile dal 30 al 70% rispetto ai soggetti non portatori. In un soggetto omozigote per la mutazione C679X ed in uno etero-composto portatore della mutazione Y142X e di una delezione in trama dell'Arginina in posizione 97 della proteina ($\Delta R97$), i livelli di LDL-C si riducevano dell'80% circa (29). Studi di popolazione hanno dimostrato che anche alcune sostituzioni di singoli aminoacidi di PCSK9 (ad esempio p.G236S, p.R237W, p.N354I and p.S462P) co-segregano con il fenotipo ipocolesterolemia e sono associate ad una riduzione variabile ma significativa dei livelli di LDL-C (4%-30%) (30). La mutazione “missenso” più studiata è la R46L, una variante relativamente rara presente nell'1.5% della popolazione, che in diverse popolazioni è risultata associata ad una riduzione di LDL-C di circa il 15% (31) rispetto alla popolazione generale. A differenza dell'FHBL-1 dovuta a mutazioni del gene APOB, i soggetti portatori di mutazioni LOF del gene PCSK9 sono asintomatici e privi di manifestazioni cliniche di rilievo in altri organi ed apparati (*Tabella 1*).

Ipobetalipoproteinemia familiare tipo 2 (FHBL-2) da mutazioni del gene ANGPTL3

L'ipobetalipoproteinemia familiare tipo 2 (FHBL-2, OMIM #605019) è una forma di HBL primitiva identificata da Musunuru et al. (32) definita ipolipemia familiare combinata per il singolare profilo lipidico caratterizzato da bassi livelli di lipoproteine contenenti apoB ed apoA-I. Questi autori hanno identificato in una grande famiglia quattro fratelli portatori di due mutazioni diverse nel gene ANGPTL3 (S17X/E129X), codificante la Angiopoietin-like protein 3, che si traducevano in una completa perdita di funzione della proteina e

sua assenza nel plasma. Lo stato di eterozigosi-composta per mutazioni “nonsense” di ANGPTL3 si associa a ridotti livelli plasmatici di CT, TG, LDL-C ed HDL-C. Altri individui omozigoti o eterozigoti-composti per mutazioni di ANGPTL3 causa di deficit completo di ANGPTL3, che presentavano il quadro di ipolipidemia familiare combinata sono stati identificati in famiglie Italiane (33, 34). Da una analisi di tutti i soggetti con deficit di ANGPTL3 è emerso che il deficit completo (individui omozigoti) si associa ad una riduzione di circa il 60-70% di tutti i parametri lipidici mentre il deficit parziale (individui eterozigoti) si associa ad una riduzione del 15-30%, riduzione che è maggiore per i TG e molto minore per HDL-C (34). La proteina ANGPTL3 appartiene alla famiglia delle proteine angiopoietina-simili ed insieme a ANGPTL8 e ANGPTL4, è coinvolta nel controllo dei livelli di TG nel plasma e nel bilancio energetico. ANGPTL3 viene sintetizzata nel fegato e dopo la sua secrezione viene attivata da parte di proteasi. La forma attiva interagisce a livello della superficie endoteliale con la lipasi lipoproteica (LPL). Questo legame determina un cambiamento conformazionale della LPL che si traduce in una inibizione della sua attività catalitica per l'idrolisi dei TG presenti in CM e VLDL. ANGPTL3 in condizioni fisiologiche inibisce anche la lipasi endoteliale (EL) e quindi favorisce l'idrolisi dei fosfolipidi delle HDL con la formazione di HDL di piccole dimensioni e instabili che vengono rimosse più velocemente dalla circolazione. Nel difetto genetico di ANGPTL3 la mancata inibizione di questi due enzimi si traduce in un'augmenta attività dei due enzimi lipolitici. Il profilo lipidico che si osserva nella FHBL-2 è il risultato della iperattivazione della LPL che spiega i ridotti livelli plasmatici di TG e della EL che spiega i ridotti livelli di HDL-C. Il meccanismo che causa

bassi livelli di LDL-C non è ancora completamente definito (35). La prevalenza delle mutazioni LOF del gene ANGPTL3 valutata in una coorte di individui della popolazione generale con profilo lipidico suggestivo di FHBL-2 è risultata del 10% (36). I soggetti portatori di mutazioni LOF del gene ANGPTL3 sono asintomatici (*Tabella 1*).

La terapia con anticorpi monoclonali anti-PCSK9

Alla luce di quanto detto precedentemente, la strategia della inibizione della PCSK9 con i Mab risulta particolarmente efficace poiché il ruolo principale di PCSK9 è quello di modulare il catabolismo dell'LDL-R. In realtà la PCSK9 esercita diverse funzioni anche in altri distretti, ma queste o non sono considerate sostanziali, come nella parete arteriosa (25) o nel tessuto adiposo (25), o si svolgono in compartimenti non accessibili agli anticorpi, come quello cerebrale, poiché la PCSK9 era già nota per il suo ruolo nel regolare l'apoptosi delle cellule cerebrali (25).

Gli anti-PCSK9 Mab in commercio, alirocumab e evolocumab, sono completamente umanizzati, a differenza del bococizumab, il quale contiene una percentuale ridotta di sequenze murine, che probabilmente sono state la causa della formazione di anticorpi neutralizzanti nell'uomo che hanno fatto sostanzialmente fallire l'obiettivo della efficacia a medio termine nei trials di fase III (8). Alirocumab ed evolocumab hanno volumi di distribuzione simili, circa pari al volume plasmatico, e questo garantisce che non agiscano al di fuori del torrente circolatorio. La loro emivita prolungata dagli 11 ai 20 giorni (6, 7) garantisce la possibilità di essere somministrati bisettimanalmente o anche mensilmente con mantenimento degli obiettivi terapeutici. Alirocumab ed

evolocumab hanno sviluppato programmi di trial di fase II e III che hanno coinvolto decine di migliaia di pazienti ipercolesterolemici di vario genere, ed hanno dimostrato l'efficacia e la sicurezza della terapia di inibizione del PCSK9 con Mab. I trials sono stati focalizzati principalmente su tre gruppi di pazienti:

- 1) pazienti ad alto rischio;
- 2) pazienti con ipercolesterolemia familiare (FH);
- 3) pazienti intolleranti alle statine.

Pazienti ad alto rischio: alirocumab ha sviluppato i trials COMBO, OPTIONS CHOICE, i trials di estensione LONG TERM, mentre evolocumab ha sviluppato tra gli altri i LAPLACE 2, YUKAWA-2 e l'estensione a lungo termine con gli studi OSLER.

Pazienti con FH: alirocumab ha sviluppato i trials FHI, FHII e HIGH-FH, mentre evolocumab ha sviluppato i RUTHERFORD ed il TESLA dedicato ai pazienti con FH-omozigote. Pazienti intolleranti alle statine: alirocumab ha sviluppato il trial ALTERNATIVE, mentre evolocumab i trial MENDEL e GAUSS. I risultati sono sintetizzati nella figura 1 che mostra la riduzione percentuale in rapporto ai livelli di LDL-C più bassi raggiunti dal braccio del trial con anti-PCSK9 Mab. La *figura 1* mostra i valori di riduzione percentuale rapportati ai valori di LDL-C di partenza e finali. Se si escludono i trial di efficacia di evolocumab su soggetti con FH omozigote, si nota come la riduzione media ottenibile oscilla tra il 45 ed il 70%. I risultati migliori si ottengono su popolazioni ad alto rischio (triangoli), poiché i soggetti FH (cerchi) sono notoriamente più difficili da trattare. Evolocumab sembra mostrare un effetto maggiore con riduzione dei valori che raggiungono il 60-70%, ma questo potrebbe essere dovuto al fatto che alirocumab può essere titolato, mentre i

trial di fase III con evolocumab sono stati effettuati in genere con il dosaggio più elevato. I risultati sono molto rilevanti se si considera che sono stati ottenuti aggiungendo i Mab alla terapia convenzionale, permettendo quindi livelli finali di LDL-C molto bassi. Le linee orizzontali indicano i target per l'alto rischio (corrispondente a 100 mg/dL) ed il rischio molto alto (corrispondente a 70 mg/dL). La linea inferiore-

re mostra invece i livelli medi di circa 200 soggetti affetti da SGBC rivisti in una precedente revisione della letteratura (36), che corrispondono a 38 mg/dL. Come si nota, diversi trial presentano valori medi di LDL-C ottenuti al di sotto o in prossimità di tali valori, il che significa che in molti trial esistono pazienti trattati con valori paragonabili ai soggetti con SGBC. Questo dato è stato recentemente rivisitato (37) e

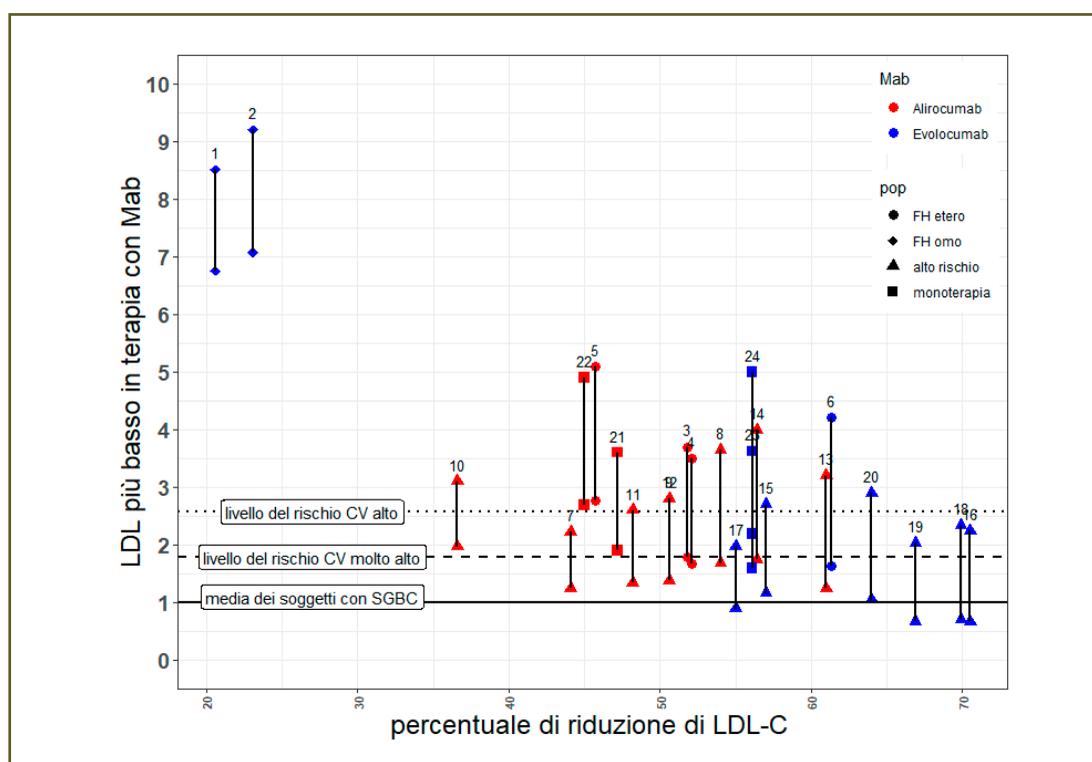


Figura I - Risultati dei trials con anti-PCSK9 Mab.

Nota: La figura mostra i risultati di efficacia sull'end-point LDL-C dei trials con alirocumab (rosso) ed evolocumab (blu). Le coorti dei trials sono indicate dalla forma dei punti come: soggetti FH eterozigoti (cerchio), FH omozigoti (rombo), soggetti ad alto rischio CV (triangolo), soggetti intolleranti alle statine (quadrato). I segmenti verticali uniscono i valori di partenza di LDL-C con i valori finali in trattamento con Mab. Le linee verticali rappresentano gli obiettivi terapeutici ed i livelli medi dei soggetti con SGBC. I trials sono indicati da numeri come segue: 1) TAUSSIG (W48), 2) TESLA-B, 3) FH I (W78), 4) FH II (W78), 5) HIGH FH (W24), 6) RUTHEFORD-2 (Q2W), 7) OPTIONS I (A20), 8) OPTIONS I (A40), 9) OPTIONS II (R10), 10) OPTIONS II (R20), 11) COMBO I, 12) COMBO II, 13) LONG TERM, 14) CHOICE II (75Q2W), 15) DESCARTES (W52), 16) LAPLACE-2 (A80), 17) LAPLACE-2 (R40), 18) YUKAWA-2 (A5), 19) YUKAWA-2 (A20), 20) OSLER-2 (W12), 21) MONO, 22) ALTERNATIVE (W24), 23) MENDEL-2 (140Q2W), 24) GAUSS-2 (Q2W). In parentesi sono indicate le statine ed i dosaggi (A=atorva, R=rosuva) e le settimane di rilevamento (W) laddove presenti. Q2W indica una durata trimestrale a dosi bisettimanali. Il numero senza lettera (75) indica il dosaggio del Mab. Non sono inclusi i trials con end-point non lipidico.

si è notato come tali livelli possono essere considerati relativamente sicuri. Si invita a leggere il breve capitolo successivo sugli effetti collaterali e la rivisitazione menzionata (37).

Rischio cardiovascolare e ipocolesterolemie primitive

Il sequenziamento sistematico di alcuni geni candidati responsabili di SGBC per la ricerca di varianti rare (con una frequenza inferiore all'1%) caratterizzate da un importante effetto biologico sul fenotipo, e studi "genome-wide" nella popolazione finalizzati ad identificare varianti geniche comuni (con frequenza dell'allele minore >5%) associate a ridotti livelli di LDL-C hanno consentito di definire le basi genetiche del fenotipo basse LDL. L'esposizione per tutta la vita a bassi livelli di LDL-C è ritenuto un fattore protettivo nei confronti del rischio CV. Le evidenze disponibili per dimostrare l'associazione tra bassi livelli di LDL-C e ridotto rischio CV derivano da studi di famiglie, studi di popolazione e di randomizzazione mendeliana. L'associazione tra presenza di varianti del gene APOB causa di FHBL-1 (quindi ad alto impatto) e rischio CV è stata supportata dalla osservazione indiretta che soggetti portatori di mutazioni patogenetiche del gene APOB avevano una "stiffness" carotidea inferiore rispetto ai controlli ma non alterazioni dello spessore intima-media (38). Solo recentemente Peloso et al. (39) hanno documentato questa associazione in 12 studi caso-controllo mediante il sequenziamento del gene APOB in circa 58.000 soggetti con e senza malattia coronarica (Coronary Heart Disease, CHD). I portatori di mutazioni del gene APOB causa di apoB troncate erano presenti in 0,038% dei casi CHD e in 0,092% dei controlli. Lo stato di portatore di apoB troncate era associato a ridotti livelli di TC, LDL-C e TG e ad

una riduzione del 73% del rischio di CHD (OR=0,28).

L'impatto delle mutazioni nonsense rare del gene PCSK9 identificate nel 2,6% della popolazione Afro-Americana nel Dallas Heart Study sul rischio di CHD è stato dimostrato essere ridotto dell'88% in un periodo di follow-up di 15 anni (40). Nello stesso studio è stato dimostrato che anche nei soggetti Caucasicci portatori della variante "missenso" R46L di PCSK9, responsabile di una riduzione modesta di LDL-C, l'incidenza di CHD era ridotta del 47%. Questo effetto è stato recentemente confermato in una meta-analisi di studi GWAS relativi a soggetti prevalentemente di origine europea (41).

L'effetto della riduzione delle LDL nel deficit di ANGPTL3 sul rischio CV è stato specificatamente affrontato in una recente pubblicazione di Stitzel et al. (42). Lo studio, mediante angiografia coronarica, di famiglie con deficit completo di ANGPTL3 (soggetti etero-composti per mutazioni LOF di ANGPTL3) non ha evidenziato presenza di placche aterosclerotiche nelle coronarie a suggerire un effetto protettivo del deficit completo di ANGPTL3 nei confronti del rischio CV. L'associazione tra presenza delle varianti di ANGPTL3 e rischio di CHD è stato valutato in una meta-analisi di numerose coorti. In questo studio di popolazione che ha preso in esame più di 180.000 individui con deficit parziale di ANGPTL3 reclutati dal Consorzio di Myocardial Infarction Genetics i portatori eterozigoti di mutazioni LOF presentavano una riduzione del 34% del rischio di CHD rispetto ai non portatori (OR=0,66).

Riduzione del rischio cardiovascolare in terapia con anti-PCSK9 Mab

Il tema della riduzione del rischio CV in terapia con Mab è molto interessante perché chiarisce alcuni punti controversi

della lipidologia, che verranno considerati in questo capitolo. Il primo punto è quello degli effetti pleiotropici delle statine. Negli anni novanta vennero realizzati due trials, il MIRACL (43) e l'ARMYDA (44). Questi trials valutarono l'effetto a breve termine della statina ad elevata potenza allora disponibile (atorvastatina) nei soggetti affetti da sindrome coronarica acuta (SCA). I trials mostrarono riduzione degli eventi CV nelle settimane successive alla SCA, tempo troppo breve per attribuire il miglioramento ad una azione sul rimodellamento di placca.

Tali effetti a breve termine vennero spiegati con una riduzione della flogosi generalizzata (misurabile con la proteina C reattiva) e con un maggiore "benessere" dell'endotelio (misurabile con riduzione dei markers di disfunzione endoteliale, come E-selectina e V-CAM), e vennero definiti effetti pleiotropici. Pertanto l'uso della atorvastatina venne introdotto nella pratica cardiologica più per l'effetto pleiotropico post SCA che per l'effetto ipolipemizzante. Questa pratica venne giustificata quando venne testato il primo ipolipemizzante di nuova generazione non statinico (ezetimibe) in un trial dedicato, chiamato ENHANCE (45).

Il trial fallì l'obiettivo primario, la riduzione dell'ispessimento medio intimale in chi aveva livelli di LDL-C più bassi grazie ad ezetimibe, anche per un disegno errato dello studio, suggerendo che la statina riducesse il rischio CV non perché riducesse l'LDL-C ma per gli effetti pleiotropici, e questo nonostante un coraggioso trial successivo, appunto il COURAGE (46), mostrasse sostanziale equivalenza tra il rischio di eventi in chi aveva fatto un angioplastica e terapia convenzionale rispetto a chi aveva fatto terapia intensiva con simvastatina ed ezetimibe. In questo contesto si inserisce la terapia con i Mab,

ancora una volta una terapia non statinica che doveva mostrare di ridurre gli eventi CV e non solo i livelli di LDL-C. Il secondo punto è legato al concetto di "the lower the better", cioè dal dato emerso dal pool dei trials che mostrava come più in basso si scendesse con i livelli di LDL-C, maggiormente si riducevano gli eventi CV nei trials. Una prima risposta è venuta dallo studio IMPROVE-IT (4), che ha mostrato riduzione del rischio con aggiunta di ezetimibe e livelli di LDL-C raggiunti inferiori ai 60 mg/dL. Ma fino a quanto in basso si poteva scendere con l'LDL-C prima che i vantaggi sul rischio CV si esaurissero? A questi due punti hanno risposto i trials FOURIER (47) con evolocumab e ODISEY OUTCOMES (48) con alirocumab. I due trials sono numericamente simili, ma alcuni elementi sono leggermente diversi. I dati sono riassunti nella *tabella 2*. La tabella mostra i due studi a confronto. Come è possibile notare i pazienti del FOURIER presentavano una maggiore prevalenza di fattori di rischio come ipertensione e diabete ma erano molto più stabili (3,4 anni dall'ultimo evento CV) rispetto ai pazienti del OUTCOMES (2,6 mesi dall'ultimo evento). Riguardo i dati dei trials, il FOURIER è durato sensibilmente di meno (2,2 anni di mediana rispetto ai 2,8 anni del OUTCOMES) ed ha raggiunto risultati simili sull'end-point primario, che comprendeva gli end-point "forti" con l'aggiunta della ospedalizzazione per angina per entrambi i trials e anche le procedure di rivascolarizzazione per il FOURIER. Entrambi hanno presentato un "hazard ratio" simile e una riduzione comparabile per gli eventi quali incidenza di infarto e ictus. Un discorso a parte merita l'end-point di mortalità totale che non è stato raggiunto nel FOURIER. Le motivazioni che sono state addotte per giustificare questa differenza sono state

legate alla differente selezione dei pazienti, molto più acuti nell'OUTCOMES, e nella differente durata dei trials, essendo mediamente più corto il FOURIER. È probabile che tempi di osservazione più lunghi garantiranno una maggiore risposta sull' endpoint di mortalità. Inoltre i trials si sono interrotti al raggiungimento del numero di eventi preventivato per l'end-point primario, e quindi ogni valutazione su quelli secondari non è suffragata da solide basi statistiche. Le riduzioni degli eventi e del rischio CV ottenute sono contenute, ma questo era da attendersi

in pazienti che erano già in trattamento massimale con terapia ipolipemizzante convenzionale, come testimoniato dai livelli di partenza di LDL-C nei soggetti che assumevano Mab, in entrambi i casi al di sotto del limite convenzionale dei 100 mg/dL. In definitiva i trials hanno esteso i dati dell'IMPROVE-IT, cioè che i vantaggi sulla riduzione del numero di eventi siano da attribuirsi alla riduzione del colesterolo e non dal tipo di statina somministrata, e anche che i benefici si ottengono anche per livelli di LDL-C inferiori a 50 mg/dL.

Tabella 2 - Confronto tra i trials FUORIER ed ODISSEY OUTCOMES.

	Fourier	Odissey outcomes
Farmaco	Evolocumab	Alirocumab
<i>Popolazione</i>		
n. soggetti (Mab/non Mab)	13784/13780	9462/9462
Sesso Maschile %	75,4/75,5	74,7/74,9
Età media	62,5/62,5	58/58
BMI	85 kg/85,5 kg	?
Ipertensione arteriosa	80,1/80,1	65,6/63,9
LDL-C all'arruolamento	92/92	87/87
Diabete Mellito	36,7/36,5	28,5/29,1
Malattia cardiovascolare (ultimo evento)	80,9/81,3	18,9/19,5
Periodo occorso dall'ultimo evento CV	3,4 anni	2,6 mesi
Malattia cerebrovascolare	19,5 /19,2	?
<i>Trial</i>		
End-Point	MCV, IM, ICT, AIN, RIV ¹	MCV, IM, ICT, AIN ¹
Durata media (mediana)	2,2 anni	2,8 anni
Eventi per gruppo	1344/1563	903/1052
Riduzione end-point primario	0,85 (0,79-0,92)	0,85 (0,78-0,93)
Riduzione infarto miocardico	0,73 (0,65- 0,82)	0,86 (0,77-0,96) ²
Riduzione ictus cerebrale	0,79 (0,66-0,95)	0,73 (0,57-0,73)
Riduzione Mortalità Totale	1,04 (0,91-1,19)	0,85 (0,83-0,98)
Riduzione Mortalità CV	1,05 (0,88-1,25)	0,88 (0,75-1,05)
Valori di LDL-C mg/dL (riduzione %) ³	30 (-54%)	53,3 (-54,7%)

La tabella mostra i due trials a confronto.

¹MCV = malattia cardiovascolare, IM = infarto miocardico, ICT = ictus ischemico, AIN = angina instabile, RIV = rivascolarizzazione. ²Infarto miocardico non fatale. ³Valori alla fine del trattamento con Mab.

Effetti collaterali della terapia con Mab anti-PCSK9

Sebbene questa rivisitazione verta sugli effetti CV dei Mab, un cenno sui dati di sicurezza deve essere fatto. In tutti i trial di fase III sono emersi pochi effetti collaterali come era auspicabile dagli studi di fase I e II. I dati dei trial mostrano che i Mab non hanno un effetto simile alle statine sullo sviluppo di mialgia, sull'aumento del CPK e delle transaminasi, mentre gli effetti principali sono stati osservati prevalentemente come reazioni locali sul sito di inoculazione del farmaco, ed in minima percentuale un effetto collaterale ha reso necessaria la sospensione del farmaco. I Mab non hanno mostrato effetti sulla incidenza di nuovi casi di diabete mellito, come osservato per le statine, né sviluppo di steatosi epatica, come evidenziato dai nuovi farmaci che inibiscono la sintesi delle lipoproteine epatiche, quali la lomitapide (49) e l'oligonucleotide anti-senso mipomersen (50). Un effetto paventato dei Mab era quello sulle funzioni cognitive cerebrali, poiché la proteina PCSK9 era già conosciuta come Neural Apoptosis Regulated Convertase 1 (NARC-1) in virtù della capacità di regolare la distruzione programmata di cellule cerebrali (25). Tale pericolo era teoricamente limitato dalla evidenza che i Mab non passano la barriera emato-encefalica, tuttavia i dati dei trial hanno confermato come non vi fosse un deterioramento dei test cognitivi nei soggetti in trattamento con Mab, ed infine un trial dedicato con evolocumab, l'EBBINGHAUS (51), ha dimostrato come non vi siano effetti cognitivi a medio termine, almeno nel tempo di osservazione del trial. Un effetto che è stato evidenziato nei trials di fase III è l'insorgenza di cataratta, che tuttavia non è stato osservato sia nel FOURIER che nell'OUTCOMES, al netto del breve periodo di osservazione. Poco

è noto su gli effetti extra-epatici di Mab, ad esempio è stato dimostrato un effetto modulatore sul tessuto adiposo, ed è stato visto come i portatori di una variante di PCSK9, la R46L, presentano una maggiore quantità di grasso viscerale rispetto ai controlli (52). Tuttavia l'asse glicemico non sembra essere compromesso dalla terapia con Mab (47, 48). In sintesi gli anti-PCSK9 Mab non hanno mostrato effetti collaterali rilevanti nei pochi anni di utilizzo, e bisognerà attendere ancora per valutare gli effetti a medio e lungo termine.

Conclusioni

In conclusione, la terapia con anti-PCSK9 Mab apre nuove prospettive nel controllo della malattia cardiovascolare sia in prevenzione secondaria che in soggetti ad alto rischio, dove la probabilità di un evento CV a breve è notevolmente elevata. I Mab, agendo in sinergia con la terapia convenzionale con statine ed ezetimibe, hanno permesso di raggiungere livelli estremamente bassi di LDL-C, e questo ha creato un certo disagio legato alle funzioni vitali che il colesterolo svolge nell'organismo. Tuttavia, i modelli genetici giungono in soccorso mostrando come livelli estremamente bassi di LDL-C, mantenuti al di sotto di 25 mg/dL per tutta la vita, consentano una sopravvivenza pari se non superiore a coloro che presentano livelli di CT nella norma. I trial hanno mostrato dati confortanti sugli effetti collaterali a breve e a lungo termine, ma mancano dati di sicurezza a lungo termine, data la recente commercializzazione dei Mab. Lo studio delle ipocolesterolemie primitive, in particolare da deficit di PCSK9, ci confortano per quanto riguarda quello che dovremo aspettarci quando i primi utilizzatori avranno superato le prime decadi di trattamento.

RIASSUNTO

La malattia cardiovascolare (CV) rappresenta ancora oggi la principale causa di mortalità e morbilità sia nelle popolazioni industrializzate che in quelle in via di sviluppo. Per tale motivo l'industria farmaceutica ha continuato a sviluppare nuove molecole in grado di raggiungere obiettivi più ambiziosi allo scopo di prevenire il maggior numero di eventi CV. Tra queste molecole gli anticorpi monoclonali anti proconvertasi-subtilisina-kexina 9 (anti-PCSK9-Mab) hanno dimostrato di essere in grado di raggiungere livelli molto bassi di LDL-C (anche inferiori a 20 mg/dL) in aggiunta alla terapia convenzionale. Gli anti-PCSK9-Mab hanno permesso di chiarire alcuni aspetti controversi nell'ambito della terapia ipolipemizzante. Oltre a chiarire che riducendo l'LDL-C a livelli estremamente bassi si continua a ridurre il rischio CV, hanno anche chiarito come la riduzione del rischio CV si ottenga riducendo l'LDL-C con qualunque strategia e non per particolari effetti "pleiotropici" dei farmaci. I livelli estremamente bassi di LDL-C raggiunti nei trials hanno però destato preoccupazione, nell'ipotesi che siano livelli patologici. In realtà esistono modelli genetici di ipocolesterolemia che possiamo usare per valutare quali rischi clinici si corrono a mantenere livelli estremamente bassi di LDL-C per tutta la vita, ed in particolare esiste un modello di deficit di PCSK9 che mima esattamente l'effetto terapeutico degli Anti-PCSK9-Mab. Lo scopo di questa rivisitazione è quello di illustrare l'effetto dei Mab sulla riduzione del rischio CV e di prevedere quali possano essere gli effetti a lungo termine di tale terapia continuativa descrivendo i modelli di sindromi genetiche a basso colesterolo.

Parole chiave: *Monoclonali anti-PCSK9, ipobetalipoproteinemia tipo 1, ipobetalipoproteinemia tipo 2, rischio cardiovascolare, trials clinici.*

Bibliografia

1. Pfeffer MA, Sacks FM, Moyé LA, et al. Cholesterol and Recurrent Events: a secondary prevention trial for normolipidemic patients. CARE Investigators. *Am J Cardiol.* 1995; 76: 98C-106C.
2. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. *N Engl J Med.* 1998; 339: 1349-1357.
3. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet.* 1994; 344: 1383-1389.
4. Cannon CP, Blazing MA, Giugliano RP, et al. Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med.* 2015; 372: 2387-2397.
5. Catapano AL, Graham I, De Backer G, et al. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Eur Heart J.* 2016; 37: 2999-3058.
6. EMA, Evolocumab. Summary of Product characteristics. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/003882/WC5_00194521.pdf (22 May 2017, date last accessed).
7. EMA, Evolocumab. Summary of Product characteristics. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/003766/WC5_0191398.pdf (29 May 2018, date last accessed).
8. Ridker PM, Amarencu P, Brunell R, et al. Studies of PCSK9 Inhibition and the Reduction of vascular Events (SPIRE) Investigators. Evaluating bococizumab, a monoclonal antibody to PCSK9, on lipid levels and clinical events in broad patient groups with and without prior cardiovascular events: rationale and design of the Studies of PCSK9 Inhibition and the Reduction of vascular Events (SPIRE) Lipid Lowering and SPIRE Cardiovascular Outcomes Trials. *Am Heart J.* 2016; 178: 135-144.
9. Tarugi P, Averna M. Hypobetalipoproteinemia: genetics, biochemistry, and clinical spectrum. *Adv Clin Chem.* 2011; 54: 81-107.
10. Kane JP, Havel RD. Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins, in: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, vol. II, 8th ed., McGraw Hill. New York. 2001; 2717-2752.
11. Mansbach CM, Siddiqi SA. The biogenesis of chylomicrons. *Annu Rev Physiol.* 2010; 72: 315-333.
12. G. Gusarova V, Brodsky JL, Fisher EA. Apolipoprotein B100 exit from the endoplasmic reticulum (ER) is COPII-dependent, and its lipidation

- to very low density lipoprotein occurs post-ER. *J Biol Chem.* 2003; 278: 48051-48058.
13. Fryer LG, Jones B, Duncan EJ, et al. The endoplasmic reticulum coat protein II transport machinery coordinates cellular lipid secretion and cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem.* 2014; 289: 4244-4261.
 14. Schonfeld G, Lin X, Yue P. Familial hypobetalipoproteinemia: genetics and metabolism. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62: 1372-1378.
 15. Tarugi P, Averna M, Di Leo E, et al. Molecular diagnosis of hypobetalipoproteinemia: An ENID review. *Atherosclerosis.* 2007; 195: e19- e27.
 16. Burnett JR, Zhong S, Jiang ZG, et al. Missense mutations in APOB within the betaalpha1 domain of human APOB-100 result in impaired secretion of ApoB and ApoB-containing lipoproteins in familial hypobetalipoproteinemia. *J Biol Chem.* 2007; 282: 24270-24283.
 17. Noto D, Cefalu` AB, Cannizzaro A, et al. Familial hypobetalipoproteinemia due to apolipoprotein B R463W mutation causes intestinal fat accumulation and low postprandial lipemia. *Atherosclerosis.* 2009; 206: 193-198.
 18. Zhong S, Magnolo AL, Sundaram M, et al. Non synonymous mutations within APOB in human familial hypobetalipoproteinemia: evidence for feedback inhibition of lipogenesis and postendoplasmic reticulum degradation of apolipoprotein B. *J Biol Chem.* 2010; 285: 6453-6464.
 19. P. Yilmaz BS, Mungan NO, Di Leo E, et al. Homozygous familial hypobetalipoproteinemia: a Turkish case carrying a missense mutation in apolipoprotein B. *Clin Chim Acta.* 2016; 452: 185-190.
 20. R. Schonfeld G, Patterson BW, Yablonskiy DA, et al. Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia: triglyceride assembly into VLDL particles is affected by the extent of hepatic steatosis. *J Lipid Res.* 2003; 44: 470-478.
 21. Di Leo E, Magnolo L, Bertolotti M, et al. Variable phenotypic expression of homozygous familial hypobetalipoproteinaemia due to novel APOB gene mutations. *Clin Genet.* 2008; 74: 267-273.
 22. Najah M, Di Leo E, Awatef J, et al. Identification of patients with abetalipoproteinemia and homozygous familial hypobetalipoproteinemia in Tunisia. *Clin Chim Acta.* 2009; 401: 51-56.
 23. Seidah NG, Sadr MS, Chrétien M, et al. The multifaceted proprotein convertases: their unique, redundant, complementary, and opposite functions. *J Biol Chem.* 2013; 288: 21473-21481.
 24. Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism. *J Lipid Res.* 2009; 50 (Suppl.): S172-177.
 25. Norata GD, Tavori H, Pirillo A, et al. Biology of proprotein convertase subtilisin kexin 9: beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering. *Cardiovasc Res.* 2016; 112: 429-442.
 26. Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, et al. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet.* 2005; 37: 161-165.
 27. Miyake Y, Kimura R, Kokubo Y, et al. Genetic variants in PCSK9 in the Japanese population: rare genetic variants in PCSK9 might collectively contribute to plasma LDL cholesterol levels in the general population. *Atherosclerosis.* 2008; 196: 29-36.
 28. Fasano T, Cefalu` AB, Di Leo E, et al. A novel loss of function mutation of PCSK9 gene in White subjects with low-plasma low-density lipoprotein cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 677-681.
 29. Zhao Z, Tuakli-Wosornu Y, Lagace TA, et al. Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *Am J Hum Genet.* 2006; 79: 514-523.
 30. Kotowski IK, Pertsemlidis A, Luke A, et al. A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Hum Genet.* 2006; 78: 410-422.
 31. Noto D, Arca M, Tarugi P, et al. Association between familial hypobetalipoproteinemia and the risk of diabetes. Is this the other side of the cholesterol-diabetes connection? A systematic review of literature. *Acta Diabetol.* 2017; 54: 111-122.
 32. Musunuru K, Pirruccello JP, Do R, et al. Exome sequencing, ANGPTL3 mutations, and familial combined hypolipidemia. *N Engl J Med.* 2010; 363: 2220-2227.
 33. Pisciotta L, Favari E, Magnolo L, et al. Characterization of three kindreds with familial combined hypolipidemia caused by loss-of-function mutations of ANGPTL3. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012; 5: 42-50.
 34. Minicocci I, Santini S, Cantisani V, et al. Clinical characteristics and plasma lipids in subjects with familial combined hypolipidemia: a pooled analysis. *J Lipid Res.* 2013; 54: 3481-3490.
 35. Tikka A, Jauhiainen M. The role of ANGPTL3 in controlling lipoprotein metabolism. *Endocrine.* 2016; 52: 187-193.
 36. Noto D, Cefalu` AB, Valenti V, et al. Prevalence of ANGPTL3 and APOB gene mutations in subjects with combined hypolipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 805-809.
 37. Noto D, Giammanco A, Barbagallo CM, et al.

- Anti-PCSK9 treatment: is ultra-low low-density lipoprotein cholesterol always good? *Cardiovasc Res.* 2018; 114: 1595-1604.
38. Sankatsing RR, Fouchier SW, de Haan S, et al. Hepatic and cardiovascular consequences of familial hypobetalipoproteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 1979-1984.
 39. Peloso GM, Nomura A, Khera AV, et al. Rare Protein-truncating Variants in APOB, Lower LDL-C, and Protection Against Coronary Heart Disease. *Circ Genom Precis Med.* 2019 [Epub ahead of print].
 40. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH Jr, et al. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2006; 354: 1264-1272.
 41. Hopewell JC, Malik R, Valdés-Márquez E, et al. METASTROKE Collaboration of the ISGC. Differential effects of PCSK9 variants on risk of coronary disease and ischaemic stroke. *Eur Heart J.* 2018; 39: 354-359.
 42. Stitzel NO, Khera AV, Wang X, et al. PROMIS and Myocardial Infarction Genetics Consortium Investigators. ANGPTL3 Deficiency and Protection Against Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 69: 2054-2063.
 43. Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, et al. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2001; 285: 1711-1718.
 44. Pasceri V, Patti G, Nusca A, et al. Randomized trial of atorvastatin for reduction of myocardial damage during coronary intervention: results from the ARMYDA (Atorvastatin for Reduction of MYocardial Damage during Angioplasty) study. *Circulation.* 2004; 110: 674-678.
 45. Kastelein JJ, Akdim F, Stroes ES, et al. Simvastatin with or without ezetimibe in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med.* 2008; 358: 1431-1443.
 46. Maron DJ, Hartigan PM, Neff DR. Impact of adding ezetimibe to statin to achieve low-density lipoprotein cholesterol goal (from the Clinical Outcomes Utilizing Revascularization and Aggressive Drug Evaluation [COURAGE] trial). *Am J Cardiol.* 2013; 111: 1557-1562.
 47. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, et al. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2017; 376: 1713-1722.
 48. Szarek M, White HD, Schwartz GG, et al. Alirocumab Reduces Total Nonfatal Cardiovascular and Fatal Events: The ODYSSEY OUTCOMES Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2019; 73: 387-396.
 49. Cuchel M, Meagher EA, du Toit Theron H, et al. Efficacy and safety of a microsomal triglyceride transfer protein inhibitor in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a single-arm, open-label, phase 3 study. *Lancet.* 2013; 381: 40-6.
 50. Santos RD, Duell PB, East C, et al. Long-term efficacy and safety of mipomersen in patients with familial hypercholesterolaemia: 2-year interim results of an open-label extension. *Eur Heart J.* 2015; 36: 566-575.
 51. Giugliano RP, Mach F, Zavitz K, et al. Cognitive Function in a Randomized Trial of Evolocumab. *N Engl J Med.* 2017; 377: 633-643.
 52. Baragetti A, Balzarotti G, Grigore L, et al. PCSK9 deficiency results in increased ectopic fat accumulation in experimental models and in humans. *Eur J Prev Cardiol.* 2017; 24: 1870-1877. Box 1: Le ipobetalipoproteinemie.