a cura di Francesco Purrello

Dipartimento di Biomedicina Clinica e Molecolare, Università degli Studi di Catania

PCSK9: dalla scoperta al farmaco

Antonina Giammanco[1], Davide Noto[2], Maurizio R. Averna[2]

[1]Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica, Università degli Studi di Palermo

[2]Centro di Riferimento Regionale per la prevenzione, diagnosi e cura delle Malattie rare del metabolismo - A.O.U.P. "P. Giaccone"- Palermo

INTRODUZIONE

Le dislipidemie rappresentano uno dei più importanti fattori causali dell'arteriosclerosi e delle sue complicanze d'organo, come l'infarto del miocardio, l'ictus e la vasculopatia periferica. Il trattamento appropriato delle dislipidemie rappresenta la base degli interventi di prevenzione delle malattie cardiovascolari su base ischemica. Le statine sono considerate la terapia di prima scelta per la prevenzione ed il trattamento delle malattie cardiovascolari (CV), essendo capaci di ridurre i livelli plasmatici di colesterolo LDL (LDL-C), la mortalità e la morbilità cardiovascolare, come ampiamente dimostrato da numerosi trials clinici e da studi epidemiologici. Tuttavia, nonostante la documentata efficacia delle statine, un significativo rischio cardiovascolare residuo rimane in numerosi pazienti anche dopo una terapia intensiva.

Numerosi farmaci sono attualmente disponibili in commercio e nuove terapie sono in fase di studio con l'obbiettivo di ottimizzare la terapia ipolipidemizzante. 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 (LDL-R) a livello epatico ha suggerito lo sviluppo di inibitori di questa proteina per il trattamento delle ipercolesterolemie. Fino ad oggi sono stati proposti diversi approcci per ridurre i livelli circolanti di PCSK9. Tra questi si possono annoverare 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 ed il silenziamento genico mediato da "short interfering RNA" (siRNA) o oligonucleotidi antisenso (ASO).

Allo stato attuale l'approccio più avanzato da un punto di vista clinico è rappresentato dagli anticorpi monoclonali anti-PCSK9, che sono in grado di ridurre i livelli di LDL-C fino al 70% sia in monoterapia che in aggiunta alla terapia con statine. Sono in corso diversi trials clinici di fase III, i cui risultati, saranno di grande utilità nel definire l'entità della riduzione del rischio CV e la sicurezza del loro impiego.

PCSK9: LA SCOPERTA

La scoperta delle convertasi (proprotein convertase subtilisins, PCSs) risale al 1990 come risultato di un intenso impegno nella ricerca di enzimi responsabili della maturazione di precursori proteici inattivi (1). Da allora, nove diverse PCSs sono state descritte, tra cui PCSK9 (proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9), scoperta 11 anni fa in pazienti con ipercolesterolemia familiare e denominata anche NARC-1 (Neural Apoptosis Regulated Convertase 1), la cui espressione veniva indotta in neuroni cerebellari primari in seguito all'attivazione del processo di apoptosi (2).

Parecchi studi hanno messo in evidenza diversi importanti ruoli funzionali di PCSs, sia fisiologici che patologici, come nella tumorigenesi, nel diabete, nelle infezioni virali e batteriche, nell'aterosclerosi ed in malattie degenerative come l'Alzheimer. Pertanto le PCSs sono diventate una frontiera promettente nel trattamento di diverse patologie (1).

PCSK9 riveste un ruolo chiave nel metabolismo lipidico. Inizialmente sono state descritte due mutazioni nel gene codificante per PCSK9 associate con Ipercolesterolemia Autosomica Dominante (ADH) (3). Altre mutazioni sono state associate In seguito a bassi livelli di colesterolo LDL (LDL-C) e ridotto rischio cardiovascolare, rivelando un ruolo importante di PCSK9 nella regolazione dei livelli di LDL-C (4). Studi di tipo funzionale hanno dimostrato infatti come PCSK9 sia in grado di regolare i livelli circolanti di LDL-C inducendo nel fegato la degradazione del recettore per le LDL (LDL-R).

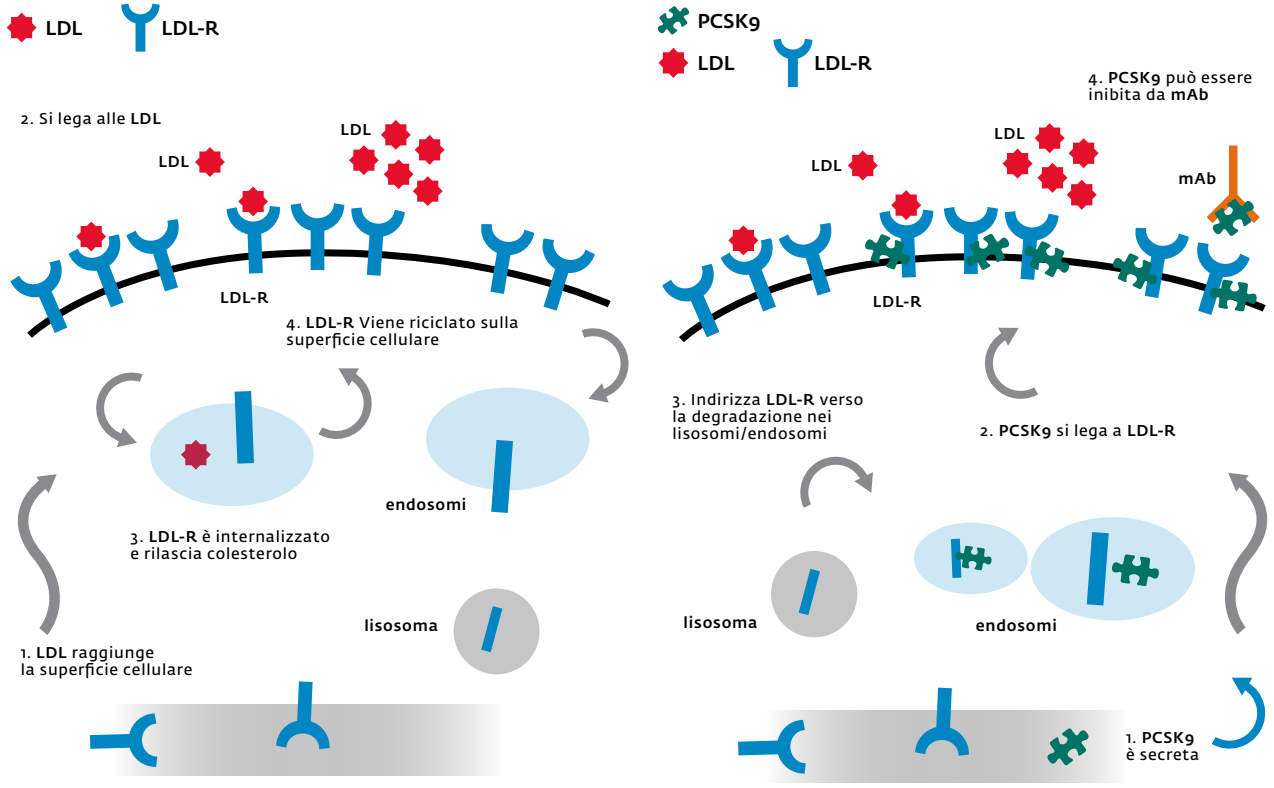
Fisiologicamente, quando si ha il legame delle particelle LDL ai recettori specifici, si ha l'internalizzazione endocellulare del complesso in vescicole che si fondono negli endosomi: qui le LDL vanno incontro a degradazione lisosomiale, mentre il recettore è "riciclato", tornando a essere esposto in superficie. Però, quando al legame tra LDL e recettore, si aggiunge anche il legame della PCSK9, si ha la degradazione a livello lisosomiale anche del recettore, che dunque non è più disponibile per il ricircolo sulla superficie cellulare. Inibendo l'attività del PCSK9 si riduce quindi il colesterolo LDL circolante attraverso l'aumento dell'espressione dei recettori per le LDL (5). Lo schema dei meccanismi funzionali intracellulari di PCSK9 ed i suoi rapporti con il recettore LDL sono mostrati in figura 1A e 1B.

Mutazioni di PCSK9 con guadagno di funzione (gain-of-function, GOF) riducono i livelli di LDL-R nel fegato, aumentando così i livelli di LDL-C plasmatici ed il rischio cardiovascolare (CV) (4). Al contrario mutazioni con perdita di funzione (loss-of-function, LOF) aumentano il numero di

Figura 1 ◆ Rappresentazione schematica dei meccanismi intracellulari ed extracellulari della proproteina convertasi subtilisina kexina 9 (PCSK9) come regolatore della degradazione del recettore delle LDL (LDL-R). Mod. da Nabil et al. Circ Res 114: 1022-1036, 2014 (5)

1A

LDL-R, una volta raggiunta la superficie cellulare (1), si lega a LDL-R (2); viene poi internalizzato e rilascia colesterolo all'interno degli endosomi nella cellula (3). LDL-R viene poi riciclato e raggiunge nuovamente la superficie cellulare (4)



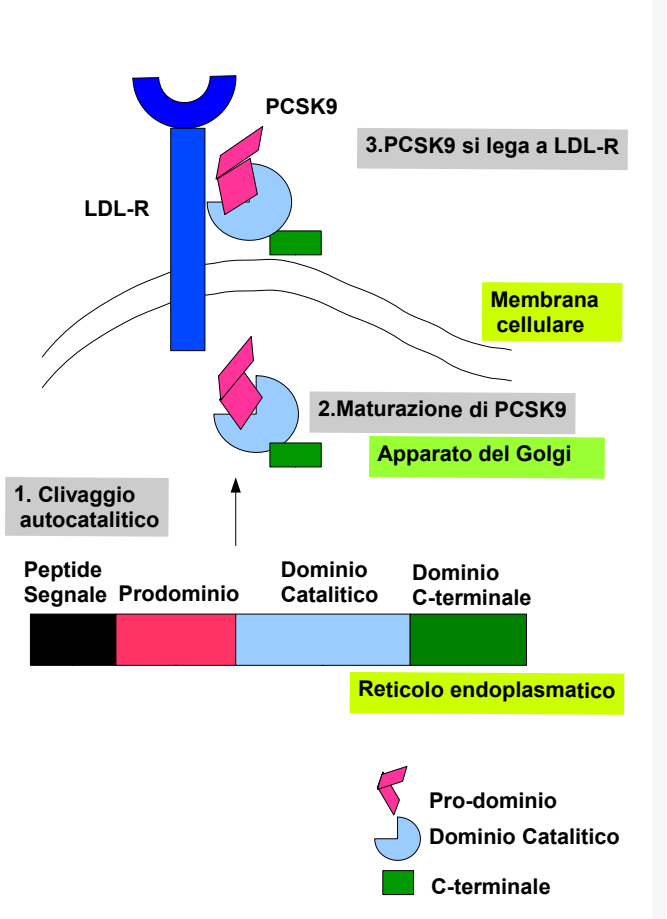
LDL-R e quindi riducono livelli di LDL-C ed il rischio di eventi cardiovascolari ischemici (4-6-7). Inoltre diversi polimorfismi di PCSK9 sono stati associati con il rischio cardiovascolare (8).

Alla luce di queste osservazioni PCSK9 rappresenta attualmente uno dei target più promettenti per lo sviluppo di terapie innovative per l'ipercolesterolemia. Questo giustifica l'intensa attività di ricerca in tal senso.

PCSK9: LA STRUTTURA

PCSK9 è una proteina di 692 amminoacidi che fa parte della classe delle serino-proteasi (appartenenti alla famiglia delle pro proteine-convertasi) (9), responsabili della maturazione proteolitica di proteine secrete, come ormoni, citochine, fattori di crescita oltre che di proteine di membrana come recettori ed integrine. La struttura delle convertasi è caratterizzata dalla presenza di un sito catalitico in grado di catalizzare l'idrolisi enzimatica di peptidi (10). PCSK9 è maggiormente espressa nel fegato, nell'intestino tenue, nel rene e nel sistema nervoso centrale. È sintetizzata come zimogeno solubile prepro-PCSK9 che viene trasformato in proproteina convertasi attiva attraverso un processo autocatalitico nel reticolo endoplasmatico (Fig. 2 punto 1). Il peptide (prodominio) dopo il suo distacco autocatalitico rimane comunque associato a PCSK9 e contribuisce alla sua secrezione; inoltre il prodominio blocca il sito catalitico (Fig. 2 punto 2). Per tale motivo PCSK9 è l'unico membro della famiglia delle PCSs per il quale non è noto alcun substrato. PCSK9 rilasciata nel torrente circolatorio è in grado di interagire con il recettore delle LDL (Fig. 2 punto 3) e favorirne la degradazione. La ridotta espressione del LDL-R è associata ad aumentati livelli circolanti di LDL-C ed ad un effetto ipercolesterolemizzante (Fig. 2, punti 1, 2 e 3). PCSK9 è presente in circolo sia come proteina libera che legata alle proteine plasmatiche. Diverse evidenze sperimentali indicano che PCSK9, agendo come binding-protein, è in grado di legare LDL-R sia a livello intracellulare che sulla superficie della membrana plasmatica degli epatociti, attraverso un meccanismo indipendente dall'attività catalitica della proteina matura (11-12). L'interazione tra il frammento clivato e il PCSK9 determina una modifica della conformazione che permette il legame con il recettore LDL (13). Se l'effetto di PCSK9 nella regolazione post-traslazionale di LDL-R e nella clearance delle LDL è stato chiarito, il suo coinvolgimento nella regolazione del rilascio di lipoproteine contenenti Apolipoproteina B (ApoB) dal fegato è un aspetto ancora discusso. 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 LDL-R (14).

Figura 2 ◆ Maturazione della proproteina convertasi subtilisina kexina 9 (PCSK9). Mod. da Nabil et al. Circ Res 114: 1022-1036, 2014 (5)



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. La sovrapproduzione di ApoB è una delle caratteristiche associate con la dislipidemia familiare combinata (familial combined hyperlipidemia, FCHL) e l'inibizione di PCSK9 potrebbe rappresentare una valida opzione terapeutica per i pazienti affetti da questa patologia.

PCSK9 è una proproteina convertasi di 692 amminoacidi sintetizzata come precursore zimogeno (pro-PCSK9). La struttura cristallina della proteina umana ha rivelato la presenza di un peptide segnale, un pro-dominio, un dominio catalitico e un dominio C-terminale. Il precursore pro-PCSK9 subisce, a livello del reticolo endoplasmatico

(1), un clivaggio autocatalitico, che risulta essenziale per la maturazione della proteina (2), che viene poi secreta. PCSK9 agisce come una proteina chaperon e si lega a LDL-R inducendone il riciclaggio sulla membrana cellulare (3). Il dominio di PCSK9 si ripiega su se stesso e contribuisce a legare LDL-R. L'esatto sito di legame è localizzato nel dominio EGF-A presente nella porzione extracellulare di LDL-R. In seguito alla sua formazione a livello della membrana plasmatica, il complesso PCSK9-LDL-R va incontro ad endocitosi clatrina-dipendente e, in seguito all'abbassamento del ph nell'endosoma, il residuo C-terminale di PCSK9 lega LDL-R stabilizzando il legame tra le due proteine. In questo modo, LDL-R viene indirizzato verso il lisosoma dove viene degradato e successivamente riciclato sulla superficie cellulare.

BIOLOGIA E RILEVANZA CLINICA DI PCSK9

Il contenuto intracellulare di colesterolo rappresenta il principale fattore in grado di regolare l'espressione genica di PCSK9 attraverso l'attivazione e la traslocazione nel nucleo del fattore di trascrizione Sterol Responsive Element Binding Protein-2 (SREBP-2) (14). L'espressione epatica di PCSK9 è infatti strettamente dipendente dal contenuto di steroli intracellulari derivati dalla degradazione del colesterolo, ed è coordinata con quella di geni coinvolti nel suo metabolismo. La HMG-CoA sintetasi, la HMG-CoA reduttasi ed il gene del recettore per le LDL (LDL-R) sono i principali geni coinvolti (15-16). Le variazioni dei livelli e della biosintesi endogena di colesterolo nel tessuto epatico sono i principali fattori che regolano l'espressione di PCSK9 e risultano essere quindi anche il maggior determinante dei livelli circolanti della proteina (17). Come conseguenza, la produzione di PCSK9 è stimolata dalla deplezione di colesterolo nell'epatocita indotta da trattamenti farmacologici ipocolesterolemizzanti come le statine (18). È stata anche descritta costantemente in numerosi studi una correlazione positiva tra i livelli circolanti di PCSK9 e i livelli di LDL-C. Questa correlazione è ridotta o completamente persa durante il trattamento con statine, che aumentano i livelli di PCSK9 nel plasma in modo dose-dipendente. Tale effetto diminuisce l'efficacia delle statine sui livelli di LDL-C (19). L'effetto dei fibrati sui livelli e sull'attività di PCSK9 è invece meno chiaro: sia una diminuzione che un aumento dei livelli circolanti di PCSK9 sono stati descritti in pazienti trattati con questa classe di farmaci ipolipidemizzanti (20-21). 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 paragonato a pazienti trattati solo con statine (22). Non risulta però esserci un effetto significativo del trattamento in monoterapia con ezetimibe sui livelli di PCSK9 plasmatici (23).
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 (24). I livelli di PCSK9 risultano aumentati nelle donne adulte nel periodo pre-menopausa mentre sono più elevati nei maschi durante la pubertà suggerendo un possibile effetto degli ormoni sessuali sull'espressione di PCSK9 (25).

INIBIZIONE DI PCSK9: APPROCCI TERAPEUTICI

La relazione tra PCSK9 ed il metabolismo del colesterolo è dimostrata da evidenze genetiche che documentano come varianti del gene che codificano per la proteina PCSK9 siano associate a variazioni dei livelli circolanti di LDL-C (26). In particolare, mutazioni geniche che comportano un'aumentata attività di PCSK9 (GOF) caratterizzano alcune forme di ipercolesterolemia familiare autosomica dominante con una normale espressione del LDL-R e con LDL che presentano normale affinità per il recettore, ma elevati livelli di LDL-C ed un aumentato rischio cardiovascolare sono comunque presenti (3).
Queste evidenze cliniche sono state confermate in un modello animale di topo in grado di esprimere elevati livelli di PCSK9 circolante e caratterizzati da una ridotta espressione del recettore per le LDL ed ipercolesterolemia; al contrario, la ridotta espressione di PCSK9 nei modelli animali era associata ad un effetto opposto colesterolo sui livelli plasmatici di LDL-C (26). Successivamente, osservazioni epidemiologiche hanno documentato in coorti di soggetti caratterizzati da bassi livelli di LDL-C circolanti la presenza di varianti geniche che determinano la sintesi di PCSK9 con una ridotta attività (LOF) associata ad ipocolesterolemia e ridotto rischio CV (4).
Queste osservazioni sono state confermate in soggetti portatori di mutazioni genetiche di PCSK9 che determinano la mancata sintesi della proteina e livelli di LDL-C di circa 15 mg/dl. Il meccanismo d'azione delle statine si basa sull'aumento dell'espressione negli epatociti di LDL-R in seguito alla deplezione intracellulare di colesterolo indotta dall'inibizione dell'enzima HMGCoA reduttasi. In parallelo all'espressione di LDL-R

viene anche attivata l'espressione di PCSK9 che diminuisce significativamente l'efficacia del trattamento con statine. Un'ulteriore osservazione, che ha ulteriormente supportato il ruolo di PCSK9 come bersaglio farmacologico per una terapia ipocolesterolemizzante, è la dimostrazione il PCSK9 circolante interagisce attivamente con il LDL-R (26). Sulla base di queste premesse, sono stati ideati numerosi approcci farmacologici, in sviluppo sia sperimentale sia clinico, mirati ad inibire l'attività di PCSK9 (Tab. 1) (27).

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 delle LDL 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.

Di particolare interesse sono gli effetti ipocolesterolemizzanti osservati in fase II di sviluppo clinico con gli anticorpi monoclonali (mAb) umani specifici per PCSK9. Il legame del mAb al PCSK9 impedisce la sua interazione con il LDL-R e di conseguenza la degradazione dello stesso con il risultato finale di favorire la captazione epatica delle LDL circolanti e la riduzione dei livelli di LDL-C (Fig. 1A e 1B).

I dati ottenuti dopo il trattamento con mAb verso PCSK9 sono molto significativi sia per l'effetto di riduzione del LDL-C osservato (-55-70%) sia per la consistenza dell'effetto in diverse tipologie di pazienti ipercolesterolemici non a target dopo trattamento con alte dosi di statine e/o ezetimibe sia per intolleranza alle statine. Gli effetti ipolipidemizzanti osservati dei mAb anti PCSK9 comprendono anche una significativa riduzione dei livelli di apo B (-57%), colesterolo totale (fino al 50%), colesterolo non-HDL (non HDL-C) (fino al 60%) e Lp(a) (-32%), ma effetti modesti su HDL-C e trigliceridi. È importante sottolineare la parallela riduzione dei livelli di PCSK9 libero nel plasma a seguito del trattamento con i mAb.

A conferma della rilevanza di PCSK9 come target farmacologico è la pubblicazione di uno studio di fase I che ha documentato l'effetto ipocolesterolemizzante del silenziamento del RNA messaggero per PCSK9 mediante RNA interference che ha evidenziato come la ridotta sintesi di PCSK9 (-70%) si associ ad un importante riduzione del LDL-C (-40%) (28).

Almeno 6 diversi mAbs contro PCSK9 sono in sviluppo clinico: Alirocumab (SAR236553/REGN727), Evolocumab (AMG145), RN316/PF-04950615, RG7652, 1B20 e LGT209 (Tab. 1). Tra questi il maggior numero di dati disponibili riguarda Alirocumab (29-30) ed Evolocumab (29-31-32).

Tabella 1 ◆ Strategie di inibizione di PCSK9 in varie fasi di sperimentazione clinica (27)

STRATEGIE DI INIBIZIONE	FARMACO	PRINCIPIO ATTIVO	DITTA/SPONSOR	FASE CLINICA
Anticorpi monoclonali	SAR236553/REGN727	Alirocumab	Sanofi/Regeron	III
	AMG 145	Evolocumab	Amgen	III
	RN316	Bococizumab	Pfizer	II
	RG7652	MPSK3169A	Roche/Genentech	II
	LGT-209		Novartis	II
Adnectina	BMS-962476		Bristol-Myers-Squibb/ Adnexus	I
Oligonucleotidi antisenso (ASO)	SPC5011		Santaris-Pharma	I (terminata)
RNA interference			Alnylam	I

Oligonucleotidi antisenso 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 (33). 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.
Altri approcci riguardano piccoli peptidi mimetici, che sono strutturalmente simili al dominio EGF-A di LDLR e competono con PCSK9 endogena per il legame con LDLR. Altre tipologie di peptidi mimetici sono ancora in fase di sviluppo e includono forme troncate di PCSK9 che contengono il dominio C-terminale che lega il recettore, ma che ha perso il segmento funzionale.
Tuttavia ad oggi sono solo evolocumab e alirocumab ad avere prodotto il maggior numero di evidenze cliniche sia di efficacia che di tollerabilità.

CONCLUSIONI

La scoperta di PCSK9 nel 2003 si è tradotta in un tempo incredibilmente breve in una terapia innovativa delle ipercolesterolemie basata sulla inibizione della proteina (Fig. 1B punto 4) (5). La terapia con statine produce aumentati livelli plasmatici di LDL-R e questo suggerisce che la riduzione dei livelli di PCSK9 potrebbe incrementare l'efficacia delle statine. L'inibizione farmacologica di PCSK9 riduce efficacemente i livelli di LDL-C e migliora gli altri parametri lipidici, come i livelli di ceramidi e Lp(a). Gli anticorpi monoclonali sono allo stato attuale i più avanzati inibitori di PCSK9 in termini di sviluppo farmacologico e risposta clinica. Studi a lungo termine stabiliranno se gli effetti benefici degli inibitori di PCSK9 sui livelli di LDL-C si traducono direttamente in una sicura ed effettiva riduzione del rischio cardiovascolare. A fronte della sua apparente sicurezza, ci sono interessi ma anche perplessità sull'inibizione di PCSK9 perché ancora poco conosciamo riguardo alle sue funzioni fisiologiche globali. Tuttavia la funzione del PCSK9, dal momento della scoperta di LDLR e della sua importanza nell'ipercolesterolemia e nella regolazione da parte delle statine, rappresenta una delle poche alternative terapeutiche alle statine nella riduzione dei livelli di colesterolo. Il fatto che una mutazione con perdita di funzione di PCSK9 e l'inibizione plasmatica di PCSK9 risulti in riduzione dei livelli di colesterolo suggerisce che gli inibitori di PCSK9 potrebbero essere i prossimi farmaci di successo per il trattamento dell'ipercolesterolemia familiare e dell'ipercolesterolemia del paziente ad alto rischio cardiovascolare.

BIBLIOGRAFIA

1. Basak A. Inhibitors of proprotein convertases.
2. 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 100(3): 928-933, 2003.
3. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. Nat Genet 34(2): 154-156, 2003.
4. 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 37(2): 161-165, 2005.
5. Nabil G. Seidah, Zuhier Awan, Michel Chrétien, Majambu Mbikay PCSK9 A Key Modulator of Cardiovascular Health. Circ Res 114: 1022-1036, 2014.
6. 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 79(3): 514-523, 2006.
7. James M. McKenney, Michael J. Koren, Dean J. Kereiake Corinne Hanotin, Anne-Catherine Ferrand, Evan A. Stein J Am Coll Cardiol 59: 2344-2353, 2012.
8. Norata GD, Garlaschelli K, Grigore L, Raselli S, Tramontana S, Meneghetti F, et al. Effects of PCSK9 variants on common carotid arteryintima media thickness and relation to ApoE alleles. Atherosclerosis 208(1): 177-182, 2010.
9. 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 279(47): 48865-48875, 2004.
10. Seidah NG. The proprotein convertases, 20 years later. Methods Mol Biol 768: 23-57, 2011.

11. Qian YW, Schmidt RJ, Zhang Y, Chu S, Lin A, Wang H, et al. Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis. J Lipid Res 48(47): 1488-1498, 2007.
12. Nassoury N, Blasiole DA, Tebon Oler A, Benjannet S, Hamelin J, Poupon V, et al. The cellulR trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR. Traffic 8(6): 718-732, 2007.
13. McNutt MC, Lagace TA, Horton JD. Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. J Biol Chem 282(29): 20799-20803, 2007.
14. 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. Arterioscer Thromb Vasc Biol 32(7): 1585-1595, 2010.
15. Hampton EN, Knuth MW, Li J, Harris JL, Lesley SA, Spreggon G. The self-inhibited structure of full length PCSK9 at 1.9 A reveals structural homology with resistin within the C-terminal domain. Proc Natl Acad Sci U S A 104(37): 14604-14609, 2007.
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 14(5): 413-419, 2007.
17. Persson L., Cao G, Stahle L, Sjoberg BG, Troutt JS, Konrad RJ, et al. Circulating proprotein convertase subtilisin kexin type 9 hasa diurnal rhythm synchronous with cholesterol synthesis and is reduced by fasting in humans. Arterioscler Thromb Vasc Biol 30(12): 2666-2672, 2010.
18. 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 disrupt its correlation with LDL cholesterol. J Lipid Res 51(9): 2714-2721, 2010.
19. 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 52(7): 1383-1391, 2011.
20. 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 54(6): 1038-1045, 2008.
21. Troutt JS, Alborn WE, Cao G, Konrad RJ. Fenofibrate treatment increases human serum proprotein convertase subtilisin kexin type 9 levels. J Lipid Res 51(2): 345-351, 2010.
22. 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 51(1): 140-149, 2010.
23. Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. J Clin Endocrinol Metab 94(7): 2537-2543, 2009.
24. Browning JD, Horton JD. Fasting reduces plasma proprotein convertase, subtilisin-kexin type 9 and cholesterol biosynthesis in humans. J Lipid Res 51(11): 3359-3363, 2010.
25. Tibolla G, Norata GD, Catapano AL. PCSK9: from the functional characterization to the therapeutic inhibition. Giornale Italiano dell'Arteriosclerosi 5(1): 47-66, 2014.
26. Stein EA, Swergold GD. Potential of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 based therapeutics. Curr Atheroscler Rep 15: 310, 2013.
27. Urban D, Poss J, Bohm M, Laufs U. Targeting the Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 for the Treatment of Dyslipidemia and Atherosclerosis. J Am Coll Cardiol 62: 1401-1408, 2013.
28. Fitzgerald K, Frank-Kamenetsky M, Shulga-Morskaya S, et al. Effect of an RNA interference drug on the synthesisof proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomized, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. Lancet 2013.
29. 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 60(19): 1888-1898, 2012.
30. 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 367(20): 1891-900, 2012.
31. 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 hypercholesterolemia (LAPLACE-TIMI 57): a randomized, placebo-controlled, dose-raging, phase 2 study. Lancet 380 (9858): 2007-2017, 2012.
32. 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 308(23): 2497-506, 2012.

33. 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. 48(4): 763-767, 2007r.