

# PCSK9: PUNTO DELLA SITUAZIONE E PROSPETTIVE CLINICHE

## PCSK9: present and future clinical perspectives

Gloria Balzarotti<sup>1</sup>, Gianpaolo Tibolla<sup>1,2</sup>, Alberico Luigi Catapano<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

<sup>2</sup>I.R.C.C.S. Multimedica, Sesto S. Giovanni (MI)

### Keywords

PCSK9  
Cholesterol  
Monoclonal antibodies  
Low Density Lipoprotein  
(LDL)  
LDL receptor

### Abstract

Since PCSK9 was discovered as a protein involved in hepatic low-density lipoprotein receptor (LDLR) degradation and LDL cholesterol (LDL-C) metabolism, different pharmacological approaches to inhibit this protein and lower plasma LDL-C have been developed in a very short time. This rapid evolution represents an excellent example of integration of genetics, pre-clinical and clinical research. Of note, several monoclonal antibodies (mAbs), able to bind the circulating PCSK9 and inhibit the PCSK9 mediated hepatic LDLR degradation, increase LDL-C clearance and lower plasma LDL-C up to 60% in different hypercholesterolemia patients. In this review, we will summarize the results of the phase III clinical studies that evaluated anti PCSK9 mAbs, with emphasis on the possible clinical perspectives opened by these agents that, according to the results of large cardiovascular outcome studies, could be the first significant breakthrough in cholesterol management of the post-statin era.

## Introduzione

Le malattie cardiovascolari (CVD) rappresentano ad oggi la principale causa di mortalità nei paesi occidentali industrializzati e i livelli plasmatici di colesterolo LDL (LDL-C) rappresentano uno dei principali fattori di rischio cardiovascolare. Numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato infatti che, indipendentemente dal tipo di paziente e dal valore basale di LDL-C, la riduzione dei livelli plasmatici di LDL-C si associa linearmente alla riduzione del rischio cardiovascolare [1].

L'ipercolesterolemia familiare (FH) è una malattia genetica caratterizzata da elevati livelli plasmatici di LDL-C e aumentato rischio cardiovascolare, che si può presentare con trasmissione sia dominante (*Autosomal Dominant Hypercholesterolemia*, ADH) che recessiva (*Autosomal recessive hypercholesterolemia*, ARH). Mutazioni nel gene codificante per il recettore delle LDL (LDL-R) sono responsabili di circa l'80% dei casi di ADH, ma questa patologia può essere associata anche a mutazioni a carico del gene che codifica per l'apolipoproteina B (ApoB), con la sintesi di ApoB non in grado di legare il LDLR, o a mutazioni del gene codificante per PCSK9 associate con un guadagno di funzione della proteina, scoperta inizialmente come *neural apoptosis regulated convertase 1* (NARC-1) [2]. Nel 2003 sono state individuate due mutazioni a carico di PCSK9 associate ad ADH in due famiglie francesi, in cui erano state precedentemente escluse mutazioni nei geni comunemente associati alla patologia (LDLR e apoB). Questa scoperta ha determinato un crescente interesse nei confronti di PCSK9, permettendo di individuare il ruolo chiave di questa proteina nel metabolismo del colesterolo [3].

PCSK9, enzima della classe delle proteasi, viene sintetizzato sotto forma di zimogeno solubile e trasformato in proproteina convertasi in seguito a un processo auto-catalitico a livello del reticolo endoplasmatico. Giunto a maturazione, PCSK9 viene secreto nel circolo sanguigno, dove lega il recettore delle LDL nella sua porzione extra-cellulare e ne promuove la degradazione nei lisosomi, impedendone il riciclo sulla membrana dell'epatocita.

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

La capacità di PCSK9 di regolare i livelli plasmatici di LDL-C attraverso la degradazione del recettore può essere alterata dalla presenza di diverse mutazioni geniche localizzate prevalentemente nelle regioni tradotte [4]. Nello specifico, le mutazioni a carico del gene codificante per PCSK9 possono essere classificate come:

- mutazioni con perdita di funzione di PCSK9 (LOF-*Loss of function*), associate a una riduzione dei livelli di LDL-C plasmatico e ipocolosterolemia;
- mutazioni con guadagno di funzione di PCSK9 (GOF-*Gain of function*), che determinano un incremento di LDL-C e conseguente ipercolesterolemia.

In particolare, l'osservazione che deficit genetici di PCSK9 sono associati a ridotti livelli di LDL-C ha portato allo sviluppo di diverse strategie volte all'inibizione farmacologica di questa proteina, quali anticorpi monoclonali umanizzati, *gene silencing* e piccoli peptidi inibitori [2]. Attualmente l'approccio più avanzato da un punto di vista clinico è rappresentato dagli anticorpi monoclonali (mAbs), la cui azione si traduce in una maggiore espressione del LDLR a livello epatico e in un conseguente effetto ipolipemizzante, ascrivibile prevalentemente ad una diminuzione della colesterolemia LDL ma che si esplica anche con una riduzione dei livelli di lipoproteina (a) e di trigliceridi. In questa review in particolare verranno presi in esame i tre anticorpi monoclonali in fase avanzata di sperimentazione clinica (alirocumab, evolocumab e bococizumab), valutando i risultati ad oggi disponibili e le prospettive future [5].

## Alirocumab

Alirocumab (SAR236553/REGN727\_Sanofi/Regeneron) è attualmente in valutazione all'interno del programma di sperimentazione clinica di fase III ODISSEY, il quale comprende 12 trial clinici di fase III in cui è previsto l'arruolamento di un totale di 23.000 pazienti (**Tabella 1**). Con la sola eccezione dello studio ODISSEY OUTCOMES, tutti gli altri studi hanno finito la fase di arruolamento.

ODISSEY OUTCOMES è uno studio mirato alla caratterizzazione dell'efficacia di alirocumab nel diminuire l'incidenza di eventi cardiovascolari (end point composito comprendente morte per malattia coronarica, infarto del miocardio non fatale, ictus fatale e non fatale e angina instabile con conseguente ospedalizzazione) in pazienti con recente sindrome coronarica acuta trattati con alirocumab e statina vs pazienti trattati con la sola statina [6].

ODISSEY MONO è stato il primo studio di fase III ad investigare l'efficacia nel ridurre i livelli di LDL-C di 24 settimane di trattamento con alirocumab rispetto a ezetimibe [7]. Sono stati reclutati un totale di 103 soggetti con ipercolesterolemia e moderata malattia cardiovascolare su base aterosclerotica, di cui 88 hanno completato il periodo di trattamento previsto. I risultati mostrano come alirocumab si associ ad una riduzione di LDL-C del 47% rispetto ad una riduzione del 16% ottenuta con ezetimibe ( $p < 0,0001$ ), senza differenze significative negli eventi avversi osservati nei due gruppi sperimentali.

In pazienti con ipercolesterolemia familiare, nonostante l'utilizzo di statine alle massime dosi tollerate, come monoterapia o in combinazione con altri agenti ipolipemizzanti come ezetimibe, fibrati e resine, spesso non vengono raggiunti i livelli desiderabili di LDL-C; questi soggetti rappresentano una categoria a rischio cardiovascolare molto alto, dove il raggiungimento di livelli di LDL-C  $< 70$  mg/dL o alternativamente una riduzione dei livelli di LDL-C del 50% rispetto ai livelli di partenza, rappresenta il goal terapeutico ottimale [8, 9]. Gli studi ODISSEY FH I e ODISSEY FH II hanno valutato l'efficacia e la sicurezza di alirocumab in pazienti con ipercolesterolemia familiare eterozigoti (HeFH) che non raggiungevano i livelli desiderabili di LDL-C dopo terapia con statina alla massima dose tollerata con o senza associazione con altre terapie ipolipemizzanti. Pazienti affetti da HeFH sono stati randomizzati in due gruppi uno di trattamento ogni 2 settimane (Q2W) ( $n=490$ ) con alirocumab 75 mg sottocute e con placebo sottocute ( $n=245$ ). In tutto sono stati randomizzati 735 pazienti con un'età media di 52 anni e LDL-C di 145 mg/dL. In entrambi gli studi il trattamento con alirocumab dopo 24 settimane ha ridotto i livelli di LDL-C del 49% (paragonato ad una riduzione del 9% e del 3% nei gruppo placebo dello studio ODISSEY FH I e ODISSEY FH II rispettivamente;  $p < 0,0001$  per entrambi), con necessità di aumento del dosaggio nel 43,4% dei partecipanti nello studio ODISSEY FH I e il mantenimento

Tabella 1 ODYSSEY Program

Studio	Codice NCT	Popolazione in studio	Durata	End point primario	IMP	Criteri di inclusione	Criteri di esclusione
ODYSSEY CHOICE I	NCT011926782	Ipercolesterolemia primaria	56 settimane	Variazione percentuale di LDL-C basale a 24 settimane, con o senza statine	Alirocumab (SAR236553/REGN727) Placebo	Età $\geq$ 18 anni LDL-C $\geq$ 70mg/dl e rischio cardiovascolare molto elevato O LDL-C $>$ 100mg/dl e rischio cardiovascolare moderato o elevato	MI, UA, PCI, CABG, aritmia cardiaca non controllata, TIA, rivascolarizzazione carotidea, interventi di chirurgia vascolare nei 3 mesi precedenti la randomizzazione Positività HIV Pazienti considerati inappropriati
ODYSSEY CHOICE II	NCT02023879	Ipercolesterolemia primaria non in terapia con statine	24 settimane, trattamento open-label opzionale	Variazione percentuale di LDL-C basale a 24 settimane	Alirocumab (SAR236553/REGN727) Placebo	Ipercolesterolemia primaria non adeguatamente controllata con terapia ipolipemizzante (non statinica) o dieta	LDL-C $\geq$ 70mg/dl e rischio cardiovascolare molto elevato in pazienti intolleranti alle statine LDL-C $\geq$ 100mg/dl e rischio cardiovascolare moderato o elevato LDL-C $\geq$ 160mg/dl se sottoposti solamente a dieta o a terapia ipolipemizzante (non statinica)
ODYSSEY OLE	NCT001954394	Ipercolesterolemia con terapia ipolipemizzante in corso	120 settimane	Valutazione dei parametri di sicurezza	Alirocumab (SAR236553/REGN727)	Età $\geq$ 18 anni Pazienti con ipercolesterolemia familiare eterozigote che hanno completato uno dei seguenti studi: ODYSSEY FH I, ODYSSEY FH II, ODYSSEY HIGH FH o ODYSSEY LONG TERM	Deviazioni o discontinuità di trattamento nei protocolli precedenti
ODYSSEY LONG TERM	NCT01507831	Ipercolesterolemia, rischio cardiovascolare elevato in terapia ipolipemizzante non ottimale	86 settimane	Valutazione dei parametri di sicurezza e tollerabilità	Alirocumab (SAR236553/REGN727) Placebo	Età $\geq$ 18 anni Terapia ipolipemizzante non ottimale Pazienti con ipercolesterolemia familiare eterozigote con o senza CHD documentata o rischio equivalente Pazienti con ipercolesterolemia con CHD documentata o rischio equivalente	LDL-C $<$ 70mg/dl TG $>$ 400mg/dl
ODYSSEY COMBO I	NCT01644175	Ipercolesterolemia, rischio cardiovascolare elevato in terapia statinica (massima dose tollerata) con o senza altre terapie ipolipemizzanti	52 settimane	Efficacia e sicurezza	Alirocumab (SAR236553/REGN727) Placebo (terapia statinica $\pm$ terapia ipolipemizzante)	Età $\geq$ 18 anni Terapia statinica (massima dose tollerata) con o senza altre terapie ipolipemizzanti non ottimale Pazienti con ipercolesterolemia familiare eterozigote con CHD documentata o rischio equivalente	Pazienti senza CHD documentata o rischio equivalente LDL-C $<$ 70mg/dl e storia documentata di CVD LDL-C $<$ 100mg/dl senza storia documentata di CVD TG $>$ 400mg/dl

Tabella 1 ODYSSEY Program - Continua

Studio	Codice NCT	Popolazione in studio	Durata	End point primario	IMP	Criteri di inclusione	Criteri di esclusione
ODYSSEY COMBO II	NCT01644188	Ipercolesterolemia, rischio cardiovascolare elevato in terapia statinica (massima dose tollerata)	104 settimane	Efficacia e sicurezza	Alirocumab (SAR236553/REGN727) Ezetimibe Terapia statinica	Età ≥ 18 anni Terapia statinica (massima dose tollerata) non ottimale Pazienti con ipercolesterolemia familiare eterozigote con CHD documentata o rischio equivalente	Pazienti senza CHD documentata o rischio equivalente LDL-C < 70mg/dl e storia documentata di CVD LDL-C < 100mg/dl senza storia documentata di CVD TG > 400mg/dl
ODYSSEY FH I	NCT01623115	Ipercolesterolemia familiare eterozigote in terapia ipolipemizzante non ottimale	24 settimane	Variazione percentuale di LDL-C basale a 24 settimane	Alirocumab (SAR236553/REGN727) Placebo	Età ≥ 18 anni Terapia ipolipemizzante non ottimale Pazienti con ipercolesterolemia familiare eterozigote	LDL-C < 70mg/dl e CVD LDL-C < 100mg/dl senza CVD TG > 400mg/dl Storia familiare di ipercolesterolemia omozigote
ODYSSEY FH II	NCT01709500	Ipercolesterolemia familiare eterozigote in terapia ipolipemizzante non ottimale	24 settimane	Variazione percentuale di LDL-C basale a 24 settimane	Alirocumab (SAR236553/REGN727) Placebo (baseline atorvastatina, simvastatina o rosuvastatina)	Età ≥ 18 anni Terapia ipolipemizzante non ottimale Pazienti con ipercolesterolemia familiare eterozigote	LDL-C < 70mg/dl e CVD LDL-C < 100mg/dl senza CVD TG > 400mg/dl Storia familiare di ipercolesterolemia omozigote
ODYSSEY HIGH FH	NCT01617655	Ipercolesterolemia familiare eterozigote in terapia ipolipemizzante non ottimale	52-78 settimane	Efficacia e sicurezza	Alirocumab (SAR236553/REGN727) Placebo	Età ≥ 18 anni Terapia ipolipemizzante non ottimale Pazienti con ipercolesterolemia familiare eterozigote	LDL-C < 160mg/dl e CVD TG > 400mg/dl Storia familiare di ipercolesterolemia omozigote
ODYSSEY OUTCOMES	NCT01663402	Pazienti dopo ACS	64 mesi	Tempo dalla randomizzazione a uno dei seguenti eventi: CHD, morte, MI non fatale, ictus fatale e non fatale, UA con ospedalizzazione	Alirocumab (SAR236553/REGN727) Placebo	Età ≥ 40 anni Evento ACS nelle 52 settimane precedenti la randomizzazione LDL-C ≥ 70mg/dl	Età < 40 anni Evento ACS > 52 settimane dalla randomizzazione LDL-C preferibilmente < 70mg/dl in seguito a dieta e trattamento farmacologico controllati
ODYSSEY MONO	NCT01644474	Ipercolesterolemia	24 settimane	Variazione percentuale di LDL-C basale a 24 settimane	Alirocumab (SAR236553/REGN727) Ezetimibe	Età ≥ 18 anni Pazienti con ipercolesterolemia	LDL-C < 100mg/dl o > 190mg/dl TG > 400mg/dl Storia familiare di ipercolesterolemia (omozigote o eterozigote)

Tabella 1 ODISSEY Program - Continua

Studio	Codice NCT	Popolazione in studio	Durata	End point primario	IMP	Criteri di inclusione	Criteri di esclusione
ODYSSEY ALTERNATIVE	NCT01709513	Ipercolesterolemia primaria, rischio cardiovascolare moderato, alto o molto alto, intolleranza alle statine	24 settimane	Variazione percentuale di LDL-C basale a 24 settimane	Alirocumab (SAR236553/REGN727) Ezetimibe Placebo	Età ≥ 18 anni Pazienti con ipercolesterolemia primaria, rischio cardiovascolare moderato, alto o molto alto, intolleranza alle statine	LDL-C < 70mg/dl e rischio cardiovascolare molto elevato LDL-C < 100mg/dl e rischio cardiovascolare elevato o moderato
ODYSSEY OPTIONS I	NCT01730040	Ipercolesterolemia, rischio cardiovascolare elevato con terapia ipolipemizzante in corso	24 settimane	Variazione percentuale di LDL-C basale a 24 settimane	Alirocumab (SAR236553/REGN727) Ezetimibe (baseline atorvastatina o passaggio a rosuvastatina)	LDL-C ≥ 70mg/dl con CVD documentata, in terapia con atorvastatina OR non ottimale	LDL-C ≥ 100mg/dl a alto rischio cardiovascolare, in terapia non ottimale con atorvastatina LDL-C > 250mg/dl LDL-C < 70mg/dl e storia di CVD LDL-C < 100mg/dl senza storia di CVD, ma con altri fattori di rischio TG > 400mg/dl Ipercolesterolemia familiare omozigote Terapia con ezetimibe o con ipolipemizzanti diversi da atorvastatina
ODYSSEY OPTIONS II	NCT01730053	Ipercolesterolemia, rischio cardiovascolare elevato con terapia ipolipemizzante in corso	24 settimane	Variazione percentuale di LDL-C basale a 24 settimane	Alirocumab (SAR236553/REGN727) Ezetimibe (baseline osuvastatina)	LDL-C ≥ 70mg/dl, in terapia non ottimale con rosuvastatina LDL-C ≥ 100mg/dl, in terapia non ottimale con rosuvastatina e terapie ipolipemizzanti prima della visita di screening	LDL-C < 70mg/dl e storia di CVD LDL-C < 100mg/dl senza storia di CVD, ma con altri fattori di rischio TG > 400mg/dl Ipercolesterolemia familiare omozigote, MI, UA con ospedalizzazione, PCI, CABG, aritmia cardiaca non controllata, stroke, TIA, rivascolarizzazione carotidea, interventi di chirurgia vascolari nei 3 mesi precedenti la visita di screening Presenza di patologie endocrine

IMP=Investigational Medicine Product; ATP=Adult Treatment Panel; CABG=bypass aorto-coronario; CHD=malattia coronarica cardiaca; CHD=malattia coronarica cardiaca; HDL-C=colesterolo HDL; LAD=arteria discendente anteriore; LDL-C=colesterolo LDL; LVEF=frazione di eiezione del ventricolo sinistro; MI=infarto del miocardio; NCEP=National Cholesterol Education Program; NYHA=New York Heart Association; PAV=percentuale del volume dell'arteria; PCI=intervento coronarico percutaneo; TE-SAE=treatment-emergent serious adverse events; TIA=attacco ischemico transitorio; TG=trigliceridi; UA=angina instabile

della riduzione dei livelli di LDL-C per tutta la durata dei trial (52 settimane). Il dato sorprendente riguarda soprattutto la percentuale di pazienti in grado di raggiungere i livelli target di LDL-C: 72% vs 2% e 81 vs 11% nello studio ODISSEY FH I e nello studio ODISSEY FH II rispettivamente. Lo studio ODISSEY HIGH FH ha invece valutato l'efficacia e la sicurezza di alirocumab in pazienti con FH severa [10, 11]. Nello studio sono stati reclutati 107 pazienti, la metà con storia personale di malattia coronarica, con un valore medio di LDL-C plasmatico di 160 mg/dL, nonostante concomitante terapia con la massima dose di agenti ipolipemizzanti tollerata (80% in trattamento con statina ad alte dosi e 27% in trattamento con ezetimibe). Il trattamento con alirocumab ha ridotto i livelli di LDL-C del 46% dopo 24 settimane (paragonato ad una riduzione del 11% nel gruppo placebo;  $p < 0,0001$ ), riduzione mantenuta durante le 52 settimane di trattamento. Anche in questo caso il trattamento con alirocumab ha significativamente aumentato la percentuale di pazienti a target; 57% vs 11% e 32% vs 3% hanno raggiunto livelli di colesterolo  $< 100$ mg/dL e  $< 70$ mg/dL rispettivamente ( $p < 0,0001$  per entrambi). In tutti gli studi sopra citati in pazienti HeFH, il trattamento con alirocumab si è dimostrato sicuro e ben tollerato, con una bassa incidenza di eventi collaterali non gravi, per lo più reazioni localizzate nel sito di iniezione, dimostrando come il trattamento sperimentale con alirocumab faciliti, in modo sicuro, il raggiungimento dei goal terapeutici di LDL-C in questa classe di pazienti a rischio molto alto. Lo studio ODISSEY LONG TERM ha invece valutato la tollerabilità e l'efficacia di alirocumab vs placebo in 2341 pazienti con alto rischio di patologia cardiovascolare su base aterosclerotica [12], in trattamento con la massima dose di statina tollerata con o senza associazione con altri agenti ipolipemizzanti e un valore di LDL-C  $> 70$  mg/dL. I pazienti sono stati randomizzati in doppio cieco al trattamento con alirocumab 150 mg ( $n=1553$ ) o placebo ( $n=788$ ) per via sottocutanea ogni due settimane. Il trattamento con alirocumab ha ridotto i livelli di LDL-C del 61% dopo 52 settimane di trattamento, con una percentuale di pazienti a target pari all'81%. Un'analisi *post-hoc* mirata a valutare l'efficacia nella riduzione degli eventi cardiovascolari ha mostrato poi come l'incidenza di eventi fosse ridotta del 54% nel gruppo trattato con alirocumab vs placebo (HR 0,46; IC 95% 0,26-0,82;  $p < 0,01$ ). L'efficacia è stata poi valutata in diversi sottogruppi dello studio, con risultati comparabili indipendentemente da sesso, età, indice di massa corporea e diagnosi di HeFH, diabete o malattia renale. Aspetto rilevante è che una significativa percentuale di pazienti hanno raggiunto livelli di LDL-C  $< 25$  mg/dL, senza differenza nell'incidenza di eventi avversi emergenti collegati alla terapia [13].

Nello studio ODISSEY ALTERNATIVE sono stati invece reclutati pazienti con intolleranza alle statine, valutata come storia clinica di intolleranza ad almeno due statine di cui almeno una alla dose più bassa, un gruppo di pazienti dove mancano dati robusti e raccolti in un ampio numero di soggetti da trial clinici con farmaci ipolipemizzanti [14, 15]. Sono stati reclutati nello studio 361 soggetti; di questi 47 sono stati esclusi durante la fase di *run-in* (4 settimane) con placebo, di cui 25 per effetti collaterali di natura muscolo-scheletrica. I rimanenti 314 soggetti sono stati randomizzati in tre gruppi sperimentali: alirocumab 75 mg/150 mg (aumento della dose dopo valutazione dei livelli di LDL-C alla ottava settimana di trattamento) per via sottocutanea ogni due settimane e placebo per via orale una volta al dì, oppure atorvastatina 20 mg (*statin rechallenge*) o ezetimibe una volta al dì e placebo per via sottocutanea ogni due settimane. L'incidenza di effetti collaterali è risultata simile nel gruppo in trattamento con alirocumab rispetto a quello con atorvastatina e il 60% dei pazienti con storia di intolleranza ha tollerato il trattamento con atorvastatina 20 mg. Da rimarcare il fatto che l'incidenza di mialgia è stata decisamente più bassa in pazienti trattati con alirocumab nella seconda fase open-label del trial rispetto a quella osservata nella fase iniziale di somministrazione in doppio cieco (4% vs 25%). Negli studi ODISSEY OPTIONS I e II è stata invece testata in pazienti ad alto rischio cardiovascolare l'efficacia e la sicurezza di alirocumab in combinazione con atorvastatina (atorvastatina 20-40 mg, ODISSEY OPTIONS I) e rosuvastatina (rosuvastatina 10-20 mg, ODISSEY OPTIONS II) rispetto all'associazione con ezetimibe, al trattamento con una dose doppia di statina o, solo nel caso dello studio ODISSEY OPTIONS I, al cambio da terapia con atorvastatina 40 mg a rosuvastatina 40 mg [16]. Nello studio ODISSEY OPTIONS I sono stati reclutati 345 soggetti in trattamento con atorvastatina 20-40 mg; l'aggiunta di alirocumab ha diminuito i livelli di

LDL-C del 44% in soggetti in terapia con atorvastatina 20 mg e del 54% in soggetti in terapia con atorvastatina 40 mg, riduzioni significativamente maggiori rispetto agli altri tre gruppi sperimentali considerati (21% 23% per il gruppo in terapia di associazione con ezetimibe, 5% e 4,8% per il gruppo in cui è stata raddoppiata la dose di statina e 21% per il gruppo in cui si è cambiata terapia da atorvastatina 40 mg a rosuvastatina 40 mg,  $p=0,01$  per tutti). Nello studio ODISSEY OPTIONS II l'aggiunta di alirocumab ha significativamente diminuito i livelli di LDL-C del 51% e del 36% in soggetti in terapia con rosuvastatina 10 mg e 20 mg rispettivamente, rispetto al gruppo in terapia di associazione con ezetimibe dove sono state osservate riduzioni dei livelli di LDL-C pari al 14% e all'11% ( $p=0,0125$ ); mentre non sono state osservate differenze significative rispetto al gruppo passato da un trattamento con rosuvastatina 20 mg a rosuvastatina 40 mg. Il 60% dei pazienti trattati con alirocumab ha raggiunto livelli di LDL-C < 70mg/dL, rispetto al 43% nel gruppo trattato con ezetimibe e il 31% nel gruppo trattato con dose doppia di rosuvastatina. Sia gli studi ODISSEY FH che gli studi ODISSEY OPTIONS mostrano come il trattamento con alirocumab aiuti il raggiungimento del goal terapeutico di LDL-C in pazienti a rischio cardiovascolare alto e molto alto.

Nello studio ODISSEY COMBO I e II è stata invece valutata la tollerabilità e l'efficacia di alirocumab in associazione alla massima dose tollerata di statina, in presenza o assenza di altri farmaci ipolipemizzanti, in 966 soggetti ad alto rischio cardiovascolare [17]. Nello studio ODISSEY COMBO I sono stati reclutati 316 soggetti ad alto rischio con livelli medi di LDL-C di 97 mg/dL, randomizzati in due gruppi: uno trattato con placebo ( $n=107$ ) e un gruppo sperimentale trattato con alirocumab 75/150 mg ogni due settimane per 52 settimane ( $n=209$ ) [18]. I livelli di LDL-C sono stati ridotti del 48% dal trattamento con alirocumab a 24 settimane e del 42% a 52 settimane, e complessivamente il 75% dei soggetti trattati con alirocumab ha raggiunto livelli di LDL-C <70 mg/dL alla ventiquattresima settimana. Nello studio ODISSEY COMBO II sono stati invece reclutati 720 pazienti con elevati livelli di LDL-C nonostante terapia con la massima dose tollerata di statina [19] patients with hypercholesterolemia not adequately controlled with atorvastatin (20 or 40 mg. I pazienti sono stati randomizzati in due gruppi, uno trattato con ezetimibe 10 mg ( $n=241$ ) e un gruppo sperimentale trattato con alirocumab 75/150 mg ogni due settimane per 104 settimane ( $n=479$ ). Alla ventiquattresima settimana è stata osservata una riduzione del 51% dei livelli di LDL-C nei pazienti trattati con alirocumab rispetto ad una riduzione del 30% in pazienti trattati con ezetimibe; mentre la percentuale di pazienti con livelli di LDL-C <70 mg/dL è risultata essere pari al 77% e al 46% rispettivamente, con il 60% dei pazienti trattati con alirocumab aventi livelli di LDL-C <50mg/dL. In entrambi i trial non sono state riscontrate differenze nell'incidenza di eventi avversi dipendenti dal trattamento con alirocumab. Un riassunto dei risultati ottenuti negli studi clinici di fase III con alirocumab è mostrato in **Tabella 2**.

**Tabella 2** Risultati dei trials clinici di fase III con alirocumab

Studio	Popolazione	Durata	% riduzione LDL-C		P value
			Alirocumab	Trattamento di confronto	
MONO	Ipercolesterolemia e rischio cardiovascolare moderato	24 settimane	47 %	16 % (ezetimibe)	$p<0,0001$
FH I	HeFH	24 settimane	49 %	9 % (placebo)	$p<0,0001$
FH II	HeFH	24 settimane	49 %	3 % (placebo)	$p<0,0001$
HIGH FH	HeFH	24 settimane	46 %	7 % (placebo)	$p<0,0001$
LONG TERM	Rischio cardiovascolare alto ASCVD/HeFH	52 settimane	57 %	+4 (placebo)	$p<0,0001$
ALTERNATIVE	Rischio cardiovascolare alto e intolleranza ad almeno due statine	24 settimane	45 %	15 % (ezetimibe)	$p<0,0001$
OPTIONS I	Rischio cardiovascolare alto	24 settimane	44-54 %	21-23 % (ezetimibe) 5% (doppia dose di statina) 21% (cambio di statina)	$p=0,01$
OPTIONS II	Rischio cardiovascolare alto	24 settimane	35-51 %	11-14 % (ezetimibe) 16% (doppia dose di statina)	$p=0,0125$
COMBO I	Rischio cardiovascolare alto	24 settimane	48 %	2% (placebo)	$p<0,0001$
COMBO II	Rischio cardiovascolare alto	24 settimane	51 %	21% (ezetimibe)	$p<0,0001$

LDL-C=colesterolo LDL, FH=ipercolesterolemia familiare, HeFH=ipercolesterolemia familiare eterozigote

## Evolocumab

Evolocumab (AMG145\_Amgen) è attualmente in valutazione all'interno del programma di sperimentazione clinica di fase II/III PROFICIO (*Program to Reduce LDL-C and cardiovascular Outcomes Following Inhibition of PCSK9 In different pOpulations*, **Tabella 3**). In totale il programma include 20 trial clinici, di cui 14 di fase III, in cui viene valutata l'efficacia e la sicurezza di evolocumab somministrato ogni due settimane o una volta al mese in combinazione con altri agenti ipolipemizzanti o in monoterapia nelle seguenti popolazioni:

- In combinazione con statine in pazienti con ipercolesterolemia (LAPLACE-2 e YUKAWA-2).
- In pazienti ipercolesterolemici intolleranti alle statine (GAUSS2/GAUSS3).
- In pazienti ipercolesterolemici come monoterapia (MENDEL-2).
- In pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare sia nella forma eterozigote (RUTHERFORD-2 e TAUSSIG) che omozigote (TESLA e TAUSSIG).

Cinque studi forniranno poi dati sulla sicurezza e l'efficacia della somministrazione di evolocumab a lungo termine, tra questi in particolare lo studio FOURIER (*Further cardiovascular Outcomes Research with PCSK9 Inhibition in subjects with Elevated Risk*) valuterà come il trattamento con evolocumab in associazione con statina rispetto al trattamento con statina e placebo riduca l'incidenza di eventi cardiovascolari in pazienti ad alto rischio cardiovascolare (n=22.500). L'end point primario dello studio è l'incidenza di eventi cardiovascolari definiti come morte per malattia cardiovascolare o come infarto del miocardio, ospedalizzazione per angina instabile, ictus e intervento di riperfusione coronarica.

Lo studio MENDEL-2 ha valutato l'efficacia e la sicurezza di evolocumab come monoterapia in una popolazione (n=615) a basso rischio con valori medi di LDL-C pari a 140 mg/dL, senza precedente terapia ipolipemizzante [20]. Il trattamento con evolocumab ha ridotto i livelli di LDL-C del 57% e del 56% nei pazienti che hanno ricevuto rispettivamente una somministrazione del farmaco ogni due settimane e ogni mese (paragonato ad una riduzione del 18% e del 19% nel gruppo trattato con ezetimibe e placebo). In entrambi i casi il trattamento con alirocumab ha significativamente aumentato la percentuale di pazienti che hanno raggiunto livelli di LDL-C <70mg/dL (69% e 72% rispetto al trattamento con ezetimibe e placebo, 2% e 1%). Nello studio DESCARTES sono stati invece reclutati pazienti con LDL-C >75 mg/dL caratterizzati da diversi livelli di rischio cardiovascolare (n=901), successivamente randomizzati (2:1) in due gruppi: il primo trattato con evolocumab 420 mg una volta al mese e il secondo trattato con placebo [21]. Un totale di 800 soggetti ha completato lo studio a 52 settimane e i risultati mostrano una riduzione del 57% associata al trattamento con evolocumab, con una percentuale di soggetti con LDL-C <70 mg/dL pari all'82%. In entrambi gli studi non sono state riscontrate differenze significative nell'incidenza di eventi avversi.

Lo studio LAPLACE-2 ha comparato la sicurezza e l'efficacia di evolocumab in pazienti ipercolesterolemici, in associazione con terapia con statina ad alta o moderata potenza [22]. Sono stati randomizzati 1899 pazienti in cinque gruppi di terapia con statine: due gruppi in terapia con statine ad alta potenza (atorvastatina 80 mg o rosuvastatina 40 mg) e tre gruppi in terapia con statine a bassa potenza (simvastatina 40 mg, atorvastatina 10 mg o rosuvastatina 5 mg). I pazienti sono stati poi ulteriormente randomizzati in tre gruppi: il primo in trattamento con evolocumab e placebo (n=1117), il secondo in trattamento con ezetimibe e placebo (n=221) e il terzo con solo placebo (n=558). In tutti i gruppi di trattamento con evolocumab sono state osservate riduzioni significative dei livelli plasmatici di LDL-C rispetto ai gruppi trattati con placebo (riduzioni dal 63% al 75% rispetto a riduzioni dal 19% al 32% osservate nei gruppi trattati con ezetimibe). Globalmente i risultati dello studio LAPLACE-2 mostrano come il trattamento con evolocumab in aggiunta alla terapia con statine riduca significativamente i livelli di LDL-C indipendentemente dal tipo e dal dosaggio di statina utilizzati. Nello studio GAUSS-2 si è invece valutata la sicurezza e l'efficacia di evolocumab 140 mg somministrato ogni due settimane o di evolocumab 420 mg somministrato con cadenza mensile in pazienti intolleranti alle statine [23]. Sono stati reclutati nello specifico pazienti ipercolesterolemici con documentata intolleranza ad almeno due



statine, con una popolazione finale comprendente il 50% di soggetti intolleranti a tre statine e il 22% dei soggetti intollerante a quattro o più statine. I pazienti sono stati quindi trattati con evolocumab o ezetimibe e i risultati mostrano come il trattamento con evolocumab si associ ad una maggiore riduzione dei livelli plasmatici di LDL-C (56% rispetto a 18% nel gruppo trattato con ezetimibe). Aspetto interessante è l'incidenza di mialgia, che è risultata significativamente più elevata nel gruppo trattato con ezetimibe (18%) rispetto al gruppo trattato con evolocumab (8%), a suggerire che la comparsa di sintomatologia muscolo-scheletrica non è correlata all'efficacia con cui si abbassano i livelli plasmatici di LDL-C.

Nello studio RUTHERFORD-2, 331 pazienti con ipercolesterolemia familiare eterozigote e con livelli di LDL-C >100 mg/dL [24] nonostante concomitante terapia con statina ed ezetimibe sono stati randomizzati in quattro gruppi di trattamento: il primo trattato con evolocumab 140 mg somministrato ogni due settimane e il secondo trattato con evolocumab 420 mg somministrato ogni mese, paragonati ai rispettivi gruppi trattati con placebo. Entrambi i regimi terapeutici si sono dimostrati efficaci nel diminuire i livelli di LDL-C (61% e 56% rispettivamente nel gruppo trattato con evolocumab 140 mg somministrato ogni due settimane e nel gruppo trattato con evolocumab 420 mg somministrato ogni mese). L'efficacia di evolocumab è stata anche valutata nello studio TESLA part B in 50 pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare nella forma omozigote (45% di soggetti omozigoti e 47% di soggetti compound) [25], in terapia con statina (100%) ed ezetimibe (91%). I risultati, come atteso dalla farmacodinamica del composto, mostrano come l'inibizione di PCSK9 sia in grado di abbassare i livelli di LDL-C in modo dipendente dal tipo di mutazione. Nello specifico in pazienti con mutazioni associate a completa assenza di attività del recettore sono state osservate riduzioni significativamente minori dei livelli di LDL-C rispetto a pazienti con mutazioni associate con una perdita parziale dell'attività del recettore (-21% contro -41%). Inoltre in un paziente con due mutazioni associate con perdita completa di attività recettoriale e in un paziente affetto da ipercolesterolemia familiare recessiva non sono state riscontrate riduzioni significative dei livelli di LDL-C, suggerendo che l'attività recettoriale è un requisito fondamentale per l'efficacia terapeutica degli anticorpi monoclonali antiPCSK9. Un riassunto dei risultati ottenuti negli studi clinici di fase III con evolocumab è mostrato in **Tabella 4**.

## Bococizumab

Bococizumab (RN316\_Pfizer) è un anticorpo monoclonale umanizzato in grado di legare ed inibire PCSK9, la cui efficacia e sicurezza è stata investigata in studi clinici di fase I e di fase II [26]. Bococizumab è attualmente in fase III di sperimentazione clinica all'interno del programma SPIRE, che comprende 5 studi di intervento di fase III tra cui SPIRE-HF, SPIRE-HR, SPIRE-LDL e due studi SPIRE-1 e SPIRE-2 mirati allo studio dell'efficacia di bococizumab nel ridurre l'incidenza di eventi cardiovascolari in pazienti ad alto rischio cardiovascolare. Ad oggi sono disponibili dati degli studi di fase I e di fase II. Gumbiner et al. hanno presentato i risultati di due studi clinici di fase II nei quali sono stati trattati pazienti ipercolesterolemici (LDL-C  $\geq$ 100 mg/dL e concomitante terapia con statina alla massima dose tollerata) per 12 o 20 settimane con bococizumab una volta al mese per via sottocutanea ai seguenti dosaggi: 0,25, 1, 3 e 6 mg/Kg [27]. I risultati mostrano come complessivamente alla quarta e alla dodicesima settimana di trattamento i livelli di LDL-C si siano significativamente ridotti, rispetto al trattamento con placebo, del 58% e del 46% nel gruppo a dosaggio 3 mg/Kg e del 80% e del 46% nel gruppo a dosaggio 6 mg/Kg. L'apparente riduzione di efficacia alla dodicesima settimana è imputabile alla decisione di interrompere il trattamento nel 30% dei soggetti in cui i livelli di LDL-C scendevano al di sotto di 25 mg/dL.

Recentemente sono stati anche pubblicati i risultati [28] del trattamento con bococizumab per 24 settimane a diversi dosaggi e posologia (50 mg, 100 mg e 150 mg sottocute ogni due settimane e 200 mg e 300 mg sottocute ogni mese) in pazienti ipercolesterolemici in terapia con statine e LDL-C  $\geq$ 80mg/dL. Peculiarità di questo studio di fase 2b è stata la decisione di ridurre il dosaggio in quei pazienti in cui i livelli di LDL-C scendevano al di sotto di 25 mg/dL e la predisposizione di un modello predittivo dei valori di LDL-C in assenza di riduzione della dose. I risultati mostrano

Tabella 3 PROFICIO Program - *Continua*

Studio	Codice NCT	Popolazione in studio	Durata	Endpoint primario	IMP	Criteri di inclusione	Criteri di esclusione
RUTHERFORD-2	NCT01763918	HeFH	12 settimane	Variazione percentuale media di LDL-C rispetto alla baseline	Evolocumab (AMG145) Placebo	Età 18-80 anni Diagnosi di HeFH Trattamento ipolipemizzante LDL-C $\geq$ 100mg/dl TG $\leq$ 400mg/dl	HoFH LDL o plasmaferesi NYHA III o IV Aritmia cardiaca, ipertensione, ipotiroidismo o ipertiroidismo non controllati Diabete mellito (Tipo 1, Tipo 2 scarsamente controllato)
TAUSSIG	NCT01624142	Ipercolesterolemia per cause genetiche (es. mutazioni nel LDLR o PCSK9)	5 anni	Incidenza di eventi avversi	Evolocumab (AMG145)	Partecipazione a un protocollo precedente dello studio Diagnosi di FH (età 12-80 anni) Dieta povera di grassi e terapia ipolipemizzante ( $\geq$ 4 sett) LDL-C $\geq$ 130mg/dl (senza diagnosi di CHD) LDL-C $\geq$ 100mg/dl (con diagnosi CHD) Pazienti in aferesi TG $<$ 400mg/dl Peso corporeo $\geq$ 40kg (per età $<$ 18)	NYHA III o IV o LVEF $<$ 30% MI, UA, PCI, CABG o ictus nei precedenti 3 mesi Intervento chirurgico cardiaco o di rivascularizzazione in programma Aritmia cardiaca o ipertensione non controllata
TESLA	NCT01588496	HoFH	12 settimane	Variazione percentuale media di LDL-C rispetto alla baseline	Evolocumab (AMG145) Placebo	Età 12-80 anni Diagnosi di HoFH Trattamento ipolipemizzante ( $\geq$ 4 sett) LDL-C $\geq$ 130mg/dl TG $\leq$ 400mg/dl Peso corporeo $\geq$ 40kg	LDL o plasmaferesi entro 8 settimane dalle pre-randomizzazione NYHA III o IV o LVEF $<$ 30% MI, UA, PCI, CABG o ictus nei precedenti 3 mesi Intervento chirurgico cardiaco o di rivascularizzazione in programma Aritmia cardiaca o ipertensione non controllata
FOURIER	NCT01764633	Pazienti ad alto rischio cardiovascolare nonostante efficace terapia con statine	5 anni	Morte cardiovascolare	Evolocumab (AMG145) Placebo	Età 40-85 anni Storia clinica di malattia cardiovascolare LDL-C $\geq$ 70mg/d o non HDL-C $\geq$ 100mg/dl TG $\leq$ 400mg/dl	LDL o plasmaferesi NYHA III o IV o LVEF $<$ 30% Ipertiroidismo o ipotiroidismo non trattato HoFH Aritmia cardiaca o ipertensione non controllata
GLAGOV	NCT01813422	Pazienti con malattia coronarica, in terapia con statine e sottoposti ad angioplastica coronarica	78 settimane	Cambio nominale nel PAV rispetto alla baseline, determinato attraverso IVUS	Evolocumab (AMG145) Placebo	Indicazione clinica di coronarografia Trattamento ipolipemizzante LDL-C $\geq$ 80mg/dl (con o senza fattori di rischio addizionali) LDL-C $\geq$ 60- $<$ 80mg/dl (in presenza di un fattore di rischio maggiore o di 3 fattori di rischio minore) Evidenza di malattia coronarica o PCI Riduzione del diametro del lume $<$ 50% nel LAD	CABG $<$ 6 settimane NYHA III o IV o LVEF $<$ 30% Ictus emorragico TG $\geq$ 400mg/dl Diabete mellito (Tipo 1, Tipo 2 scarsamente controllato) Disfunzione renale moderata o severa

Tabella 3 PROFICIO Program - Continua

Studio	Codice NCT	Popolazione in studio	Durata	Endpoint primario	IMP	Criteri di inclusione	Criteri di esclusione
YUKAWA-2	NCT019533328	Pazienti giapponesi ad alto rischio cardiovascolare, in terapia con statine	12 settimane	Variazione percentuale di LDL-C rispetto alla baseline	Evolocumab (AMG145) Statine Placebo	Adulti giapponesi, età 20-85 anni Trattamento ipolipemizzante ( $\geq 4$ sett) LDL-C $\geq 100$ mg/dl TG $\leq 400$ mg/dl Alto rischio di eventi cardiovascolari	NYHA III o IV Diabete mellito (Tipo 1, Tipo 2 scarsamente controllato) Aritmia cardiaca, ipertensione, ipertiroidismo o ipotiroidismo non controllati
DESCARTES	NCT01516879	Ipercolesterolemia, ampio range di fattori di rischio cardiovascolare	52 settimane	Variazione percentuale di LDL-C rispetto alla baseline	Evolocumab (AMG145) Placebo (con statine di background)	LDL-C $\geq 75$ mg/dl mentre in terapia ipolipemizzante: <100mg/dl (con diagnosi di CHD o CHD equivalente) <130mg/dl (senza diagnosi di CHD o CHD equivalente) o alla massima terapia ipolipemizzante tollerate TG $\leq 400$ mg/dl	NYHA III o IV o LVEF $< 30\%$ Diabete mellito (Tipo 1, Tipo 2 scarsamente controllato) Aritmia cardiaca o ipertensione non controllate MI, UA, PCI, CABG o ictus nei precedenti 3 mesi
LAPLACE-2	NCT01763866	Pazienti a rischio cardiovascolare, in terapia con statine	12 settimane	Variazione percentuale di LDL-C rispetto alla baseline	Evolocumab (AMG145) Ezetimibe Placebo (con statine di background)	Età 18-80 anni LDL-C $\geq 150$ mg/dl e nessun trattamento ipolipemizzante LDL-C $\geq 100$ mg/dl e trattamento non intensivo con statine LDL-C $\geq 80$ mg/dl e trattamento intensivo con statine TG $\leq 400$ mg/dl	Intolleranza alle statine NYHA III o IV Diabete mellito (Tipo 1, Tipo 2 scarsamente controllato) Aritmia cardiaca, ipertensione, ipertiroidismo o ipotiroidismo non controllati
OSLER-2	NCT01854918	Pazienti con iperlipidemia e dislipidemia mista, che hanno completato un protocollo precedente dello studio	104 settimane	Incidenza di eventi avversi	Evolocumab (AMG145) Terapia standard	Completamento di un protocollo precedente dello studio con Evolocumab	TE-SAE nel protocollo precedente Condizione medica instabile Sensibilità a uno dei trattamenti Arruolamento in altri studi clinici
MENDEL-2	NCT01763827	Pazienti con ipercolesterolemia non in trattamento con statine	12 settimane	Variazione percentuale media di LDL-C rispetto alla baseline	Evolocumab (AMG145) Ezetimibe Placebo	Età 18-80 anni NCEP ATP III Framingham risk score $\leq 10\%$ LDL-C $\geq 100$ mg/dl e $< 190$ mg/dl TG $\leq 400$ mg/dl	Storia di malattia coronarica NYHA III o IV Diabete mellito (Tipo 1, Tipo 2 scarsamente controllato) Aritmia cardiaca, ipertensione, ipertiroidismo o ipotiroidismo non controllati
GAUSS-2	NCT01763905	Pazienti intolleranti alla terapia con statine	12 settimane	Variazione percentuale media di LDL-C rispetto alla baseline	Evolocumab (AMG145) Ezetimibe Placebo	Età 18-80 anni No trattamento con statine o a bassa dose (per $\geq 4$ settimane) Storia di intolleranza alle statine (almeno 2) Livelli LDL-C non ottimali TG $\leq 400$ mg/dl	NYHA III o IV Diabete mellito (Tipo 1, Tipo 2 scarsamente controllato) Aritmia cardiaca, ipertensione, ipertiroidismo o ipotiroidismo non controllati
GAUSS-3	NCT01984424	Pazienti intolleranti alla terapia con statine	B: 24 settimane C: 2 anni	Variazione percentuale media di LDL-C rispetto alla baseline	Evolocumab (AMG145) Ezetimibe Placebo	Età 18-80 anni Trattamento ipolipemizzante (per $\geq 4$ settimane) Storia di intolleranza alle statine Livelli LDL-C non ottimali TG $\leq 400$ mg/dl	NYHA III o IV Diabete mellito (Tipo 1, Tipo 2 scarsamente controllato) Aritmia cardiaca, ipertensione, ipertiroidismo o ipotiroidismo non controllati

IMP=Investigational Medicine Product; ATP=Adult Treatment Panel; CABG=bypass aorto-coronarico; CHD=malattia coronarica cardiaca; HDL-C=colesterolo HDL; IVUS=ultrasonografia intravascolare; LAD=arteria discendente anteriore; LDL-C=colesterolo LDL; LVEF=frazione di eiezione del ventricolo sinistro; MI=infarto del miocardio; NCEP=National Cholesterol Education Program; NYHA=New York Heart Association; PAV=percentuale del volume dell'arteroma; PCI=intervento coronarico percutaneo; TE-SAE=treatment-emergent serious adverse events; TG=trigliceridi; UA=angina instabile.

**Tabella 4** Risultati dei trials clinici di fase III con Evolocumab

Studio	Popolazione	Durata	% riduzione LDL-C		P value
			Evolocumab	Trattamento di confronto	
MENDEL-2	Ipercolesterolemia e rischio cardiovascolare basso	12 settimane	56-57 %	18-19 % (ezetimibe) 0.1-1 % (placebo)	p<0,01
DESCARTES	Ipercolesterolemia	52 settimane	47-55 %	2-10 % (placebo)	p<0,001
LAPLACE-2	Ipercolesterolemia e dislipidemia mista	12 settimane	63-75 %	19-32 % (ezetimibe)	p<0,001
GAUSS-2	Ipercolesterolemia e intolleranza ad almeno due statine	12 settimane	55-56 %	37-39 % (ezetimibe)	p<0,001
RUTHERFORD-2	HeFH	12 settimane	56-61 %	-1%/+5% (ezetimibe)	p<0,001
TESLA-B	HoFH	12 settimane	23 %	+8 % (placebo)	p<0,001

LDL-C=colesterolo LDL, FH=ipercolesterolemia familiare, HeFH=ipercolesterolemia familiare eterozigote, HoFH=ipercolesterolemia familiare omozigote.

come il trattamento con bococizumab riduca i livelli di LDL-C rispetto a pazienti trattati con placebo, in modo dose dipendente e con un effetto più marcato in seguito a somministrazione ogni due settimane (33,6%, 44,9% e 52% per i pazienti trattati rispettivamente con bococizumab 50 mg, 100 mg e 150 mg ogni due settimane e -9,5% e 33,3% per i pazienti trattati con bococizumab 200 mg e 300 mg ogni mese). Il trattamento con bococizumab è risultato ben tollerato, senza differenze significative nell'incidenza di eventi avversi rispetto al gruppo placebo. Gli eventi avversi più frequenti collegati con il trattamento sono state reazioni al sito di iniezione, in particolare eritemi, e non sono state osservate differenze significative nell'incidenza di eventi avversi in relazione al raggiungimento di livelli di LDL-C <25 mg/dL. Nel 7% dei pazienti trattati con bococizumab è stata riscontrata una risposta immunitaria al farmaco con la presenza in circolo di anticorpi anti-bococizumab; ad eccezione però di un paziente in cui in seguito alla risposta anticorpale i livelli di LDL-C sono saliti fino a tornare alla base-line, non sono state osservate correlazioni significative con l'efficacia del trattamento e l'incidenza di eventi avversi, anche se questo aspetto merita ulteriori approfondimenti in studi con un campione di popolazione più ampio e tempi di osservazione più lunghi.

## Inibizione di PCSK9 e outcome cardiovascolari: le evidenze ad oggi

L'efficacia del trattamento con anticorpi monoclonali anti-PCSK9 sull'incidenza di eventi cardiovascolari fatali e non fatali è di difficile valutazione considerando i singoli trial, dato il numero limitato di pazienti e di eventi cardiovascolari osservati e la ridotta finestra temporale di osservazione. I dati degli studi di fase II e di fase III sono stati però recentemente combinati ed analizzati in una metanalisi che ha mostrato come, accanto alla riduzione dei livelli di LDL-C (47,9%; IC 95% 69,64%-25,35%; p<0,001), il trattamento con anticorpi monoclonali anti-PCSK9 ha ridotto l'incidenza di infarto del miocardio (OR 0,49; 0,26-0,93; p=0,030) [29].

Recentemente sono stati pubblicati i risultati delle analisi ad interim (78 settimane di trattamento) con alirocumab ed evolocumab sulla morbilità cardiovascolare. Lo studio ODISSEY LONG TERM, dove sono stati trattati pazienti (n=2341) [30] a rischio cardiovascolare alto e molto alto con livelli di LDL-C >70 mg/dL e in terapia con statina alla massima dose tollerata per 78 settimane con alirocumab 150 mg ogni due settimane, ha mostrato come il trattamento con alirocumab ha ridotto, rispetto al gruppo trattato con placebo, i livelli di LDL-C del 62% (p<0,001), con l'80% dei soggetti che raggiungono livelli di LDL-C <70 mg/dL. Un'analisi *post-hoc* mostra inoltre come il trattamento si associ ad una diminuzione dell'incidenza di eventi cardiovascolari considerati come morte dovuta a malattia coronarica, infarto del miocardio, ictus non fatale e ospedalizzazione in seguito ad angina instabile (1,7% vs 3,3%; p=0,02). Nello stesso tempo non sono state osservate differenze nell'incidenza di rivascolarizzazione coronarica in seguito ad evento ischemico (3,1% vs 3,0%; p=1,00) e nell'incidenza di ictus non fatale (0,6% vs 0,3%; p=0,35). Un aspetto interessante riguarda l'incidenza di eventi avversi con un numero significativamente maggiore, nei pazienti trattati con alirocumab rispetto a pazienti trattati con placebo, di reazioni nel sito di iniezione (5,9% vs 4,2%), di mialgia (5,4% vs 2,9%), di eventi oftalmologici (2,9% vs 1,9%) e di eventi avversi neuro-cognitivi (1,2% vs 0,5%), in particolare tempora-

nea perdita di memoria. In tutti i casi l'incidenza di eventi avversi non è correlata con la potenza nella riduzione dei livelli di LDL-C, in quanto non si osservano differenze significative all'interno dei pazienti trattati con alirocumab, tra quelli che raggiungono livelli di LDL-C <25 mg/dL e quelli che invece rimangono con livelli di LDL-C >25 mg/dL. Considerando il tempo limitato di follow-up dello studio e il basso numero di eventi cardiovascolari registrati, sono necessari ulteriori studi per affermare con sicurezza l'efficacia del trattamento con alirocumab nel ridurre l'incidenza di eventi e la mortalità cardiovascolare; di particolare importanza in questo senso saranno i risultati dello studio ODISSEY OUTCOMES, in previsione di completamento nel 2017.

L'efficacia di evolocumab nel ridurre l'incidenza di eventi e la mortalità cardiovascolare è stata invece recentemente valutata in due trial open-label, OSLER-1 e OSLER-2, in cui sono stati reclutati 4465 pazienti che avevano precedentemente concluso uno tra 12 studi clinici di fase II o fase III all'interno del programma PROFICIO [31]. I pazienti, indipendentemente dallo studio di origine, sono stati randomizzati in due gruppi: uno in trattamento con terapia standard ed evolocumab (140 mg ogni due settimane o 420 mg ogni mese) e un gruppo di controllo con sola terapia standard e seguiti per una media di 11,1 mesi. Il trattamento con evolocumab, rispetto al trattamento con la sola terapia standard, ha ridotto significativamente i livelli di LDL-C del 61% (da una media di 120 mg/dL a 48 mg/dL;  $p < 0,001$ ) e l'incidenza di eventi cardiovascolari ad un anno (2,18%, 31/1849 vs 0,95%, 29/2976; HR 0,47; IC 95% 0,28-0,78;  $p = 0,003$ ). Gli eventi cardiovascolari considerati sono stati morte per causa cardiovascolari, infarto del miocardio, ospedalizzazione in seguito ad angina instabile, interventi di rivascolarizzazione coronarica, ictus, ischemia cerebrale transiente e ospedalizzazione per insufficienza cardiaca. Non sono state riportate differenze significative nell'incidenza di eventi avversi tra i due gruppi sperimentali, anche se è stata riportata una frequenza maggiore di perdita di memoria (0,9% vs 0,3%), similmente a quanto osservato nello studio ODISSEY LONG TERM con alirocumab.

Osservazioni simili sono state fatte anche all'interno di studi clinici di intervento con statine [32]; studi futuri dovranno comunque valutare in maniera più approfondita ed accurata la sicurezza di questi farmaci dal punto di vista delle capacità cognitive, oltre che monitorare possibili effetti sull'apparato muscolo-scheletrico. Sono attesi da questo punto di vista i risultati dello studio EBBINGHAUS (*Evaluating PCSK9 Binding antiBody Influence on coGnitive HeAlth in High cardiovascUlar Risk Subjects*), specificamente dedicato a rilevare alterazioni nelle capacità cognitive.

## Effetto dell'inibizione di PCSK9 su altre frazioni lipidiche

Recenti studi hanno evidenziato che PCSK9, oltre a regolare i livelli di LDL-C modulando l'espressione epatica del LDLR, gioca un ruolo chiave in processi indipendenti dall'attività recettoriale, tra cui il metabolismo di lipoproteine ricche in trigliceridi (TRL) a livello intestinale ed epatico e la regolazione dei livelli di Lp(a).

Gli effetti pleiotropici di PCSK9 sono dovuti alla capacità di questa proteina di legarsi a recettori diversi dal LDLR, fra cui il recettore delle lipoproteine a densità molto bassa (VLDLR) e CD36, recettore coinvolto nel metabolismo degli acidi grassi, favorendone la degradazione [33]. Studi in vivo, effettuati in topi transgenici privi di PCSK9, hanno dimostrato che l'assenza di PCSK9 determina una riduzione significativa dei livelli plasmatici di TG post-prandiali, dovuta a una maggior clearance degli stessi dal circolo, probabilmente associata alla capacità di PCSK9 di interagire con recettori implicati nel metabolismo dei TG, quali VLDL, ApoE receptor e CD36.

Inoltre PCSK9, secreta dal fegato e rilasciata nel circolo sanguigno, lega e favorisce la degradazione dei VLDLR sulla superficie degli adipociti. Topi *knock-out* per PCSK9 presentano un'aumentata espressione dei VLDLR a livello del tessuto adiposo, che comporta un maggior assorbimento di acidi grassi liberi e un accumulo di grasso viscerale dell'80% maggiore rispetto ai topi *wild-type*, in assenza di steatosi epatica e obesità. Altri studi pre-clinici hanno evidenziato un ruolo diretto di PCSK9 nella regolazione della secrezione intestinale di TRL e nella sintesi di apoB48 [34-36]. Questi risultati suggeriscono dunque un potenziale utilizzo degli inibitori di PCSK9 nel trattamento dell'ipertrigliceridemia post-prandiale.

Per quanto riguarda l'effetto degli inibitori di PCSK9 sui livelli di Lp(a), Gaudet e col-

laboratori hanno valutato l'impatto di Alirocumab (150 mg ogni due settimane) in tre studi clinici di fase II, condotti in doppio cieco, randomizzati, verso placebo [37]. La somministrazione di alirocumab è in grado di ridurre in modo significativo la concentrazione plasmatica di Lp(a) nei soggetti trattati rispetto al placebo (30,3% vs 0,3%;  $p < 0,0001$ ). Anche la somministrazione di evolocumab per 12 settimane determina una riduzione significativa dei livelli di Lp(a) indipendentemente dalla dose usata, nel gruppo trattato rispetto al gruppo controllo (-29,5% e -24,5% per evolocumab 140 mg ogni due settimane o 420 mg ogni mese, rispettivamente;  $p < 0,001$ ) [38].

Benché i meccanismi attraverso cui PCSK9 regola i livelli di Lp(a) siano poco chiari, è interessante notare che la riduzione di Lp(a) si osserva solo dopo la somministrazione di anticorpi monoclonali contro PCSK9 e non in seguito a trattamento con RNAi (*RNA interference* - tecnica che inibisce la traduzione dell'mRNA codificante per PCSK9), suggerendo che l'effetto su Lp(a) sia in qualche modo dovuto al legame degli anticorpi con la proteina circolante. Tra le varie ipotesi vi sono che la somministrazione di mAbs anti-PCSK9 porta alla formazione di immunocomplessi (mAb-PCSK9-Lp(a) e mAb-PCSK9-LDL) in seguito rimossi dal circolo sia attraverso meccanismi target specifici recettore mediati, sia dal sistema reticolo-endoteliale.

In alternativa, la riduzione dei livelli di Lp(a) potrebbe essere mediata da una ridotta sintesi di apoB, come è recentemente emerso in alcuni studi clinici con mipomersen, un oligonucleotide antisense progettato per inibire la sintesi dell'apoB [39].

La situazione potrebbe però essere più complicata, come recentemente mostrato da dati in vitro che suggeriscono invece come l'inibizione di PCSK9 possa portare ad un aumento della clearance epatica di Lp(a) LDLR-mediata. Il coinvolgimento di LDLR nel catabolismo si vedrebbe solo in seguito a trattamento con inibitori di PCSK9 che, aumentando i livelli di LDLR sulla superficie dell'epatocita, diminuirebbero il normale contributo nel catabolismo di Lp(a) dei recettori del plasminogeno [40].

Poiché la riduzione di elevati livelli di Lp(a) in pazienti ad alto rischio cardiovascolare rappresenta ad oggi un obiettivo clinico per il quale non si hanno a disposizione valide alternative, eccetto l'utilizzo di niacina, questa nuova possibile applicazione degli inibitori di PCSK9 potrebbe essere molto interessante, indipendentemente dal meccanismo alla base.

Con i farmaci attualmente disponibili, la maggior parte dei pazienti affetti da FH, in particolare i soggetti con FH omozigote, non raggiunge i livelli target di LDL-C. Considerato il meccanismo d'azione putativo degli inibitori di PCSK9, la presenza di LDLR correttamente funzionanti sulla superficie degli epatociti dovrebbe essere essenziale per la riduzione dei livelli di LDL-C. A conferma, gli inibitori di PCSK9 sono più efficaci nel ridurre i livelli di LDL-C in pazienti con mutazioni nel gene codificante per LDLR associate a una perdita parziale di attività (*defective mutation*) che in quelli con mutazioni associate all'assenza o alla completa perdita di funzione del recettore (*null mutation*) [25, 41].

In aggiunta alla terapia farmacologica, l'aferesi delle LDL è l'approccio terapeutico di elezione nei pazienti con FH omozigote per ridurre i livelli plasmatici di LDL-C. È stato recentemente dimostrato che durante questo processo viene rimosso anche più del 50% di PCSK9 circolante, suggerendo che la rimozione di PCSK9 dal circolo possa facilitare il raggiungimento dei livelli target di colesterolo. Sulla base di questi risultati si può pensare a un eventuale utilizzo degli mAbs anti-PCSK9 in combinazione con l'aferesi, preferibilmente effettuando l'iniezione di mAbs al termine del processo di aferesi al fine di allungare il tempo necessario al ritorno ai livelli basali di LDL-C e di conseguenza la frequenza di trattamento, con possibili riduzioni della spesa a carico dei sistemi sanitari nazionali [42].

## Conclusioni

A poco più di un decennio dalla scoperta del ruolo di PCSK9 nella regolazione dei livelli epatici del recettore delle LDL e nell'omeostasi del colesterolo, sono state sviluppate molecole che abbassano i livelli plasmatici di LDL-C inibendo l'attività di PCSK9. In particolare, mAbs anti-PCSK9 hanno dimostrato una notevole efficacia nella riduzione dei livelli di LDL-C, associata a un ottimo profilo di sicurezza e tollerabilità a breve termine. Poiché le terapie ipolipemizzanti comunemente utilizzate non permettono di

raggiungere i livelli target di LDL-C in diverse popolazioni, come i soggetti affetti da FH o quelli intolleranti alle statine, questi risultati suggeriscono un importante ruolo per gli inibitori di PCSK9 nel trattamento dell'ipercolesterolemia.

Nel prossimo decennio i risultati di outcome cardiovascolare e di sicurezza a lungo termine degli studi di fase III attualmente in corso determineranno il destino di questa nuova classe di farmaci, e la possibile apertura di una nuova era nel trattamento delle ipercolesterolemie e nella prevenzione cardiovascolare.

## Bibliografia

1. Page MM and Watts GF, Emerging PCSK9 inhibitors for treating dyslipidaemia: buttressing the gaps in coronary prevention. *Expert opinion on emerging drugs* 2015; 20(2): 299-312.
2. Seidah NG, Awan Z, Chretien M, et al., PCSK9: a key modulator of cardiovascular health. *Circulation research* 2014; 114(6): 1022-1036.
3. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, et al., Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nature genetics* 2003; 34(2): 154-156.
4. Norata GD, Tibolla G and Catapano AL, Targeting PCSK9 for hypercholesterolemia. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2014; 54: 273-293.
5. Shapiro MD, Fazio S and Tavori H, Targeting PCSK9 for therapeutic gains. *Current atherosclerosis reports* 2015; 17(4): 499.
6. Schwartz GG, Bessac L, Berdan LG, et al., Effect of alirocumab, a monoclonal antibody to PCSK9, on long-term cardiovascular outcomes following acute coronary syndromes: rationale and design of the ODYSSEY outcomes trial. *American heart journal* 2014; 168(5): 682-689.
7. Roth EM and Diller P, Alirocumab for hyperlipidemia: physiology of PCSK9 inhibition, pharmacodynamics and Phase I and II clinical trial results of a PCSK9 monoclonal antibody. *Future cardiology* 2014; 10(2): 183-199.
8. European Association for Cardiovascular P, Rehabilitation, Reiner Z, et al., ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *European heart journal* 2011; 32(14): 1769-1818.
9. Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, et al., 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2014; 129(25 Suppl 2): S1-45.
10. Kastelein JJ, Robinson JG, Farnier M, et al., Efficacy and safety of alirocumab in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia not adequately controlled with current lipid-lowering therapy: design and rationale of the ODYSSEY FH studies. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 2014; 28(3): 281-289.
11. Ginsberg HN, ODYSSEY HIGH FH: Efficacy and safety of Alirocumab in patients with severe heterozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation* 2014.
12. Robinson J, Long-term safety, tolerability and efficacy of alirocumab versus placebo in high cardiovascular risk patients: first results from the ODYSSEY LONG TERM study in 2,341 patients. *Eur Heart J* 2014.
13. Robinson J, Long-term safety, tolerability and efficacy of alirocumab versus placebo in 2,341 high cardiovascular risk patients: ODYSSEY LONG TERM. *Circulation* 2014.
14. Moriarty PM, Jacobson TA, Bruckert E, et al., Efficacy and safety of alirocumab, a monoclonal antibody to PCSK9, in statin-intolerant patients: design and rationale of ODYSSEY ALTERNATIVE, a randomized phase 3 trial. *Journal of clinical lipidology* 2014; 8(6): 554-561.
15. Guyton JR, Bays HE, Grundy SM, et al., An assessment by the Statin Intolerance Panel: 2014 update. *Journal of clinical lipidology* 2014; 8(3 Suppl.): S72-81.
16. Robinson JG, Colhoun HM, Bays HE, et al., Efficacy and safety of alirocumab as add-on therapy in high-cardiovascular-risk patients with hypercholesterolemia not adequately controlled with atorvastatin (20 or 40 mg) or rosuvastatin (10 or 20 mg): design and rationale of the ODYSSEY OPTIONS Studies. *Clinical cardiology* 2014; 37(10): 597-604.
17. Colhoun HM, Robinson JG, Farnier M, et al., Efficacy and safety of alirocumab, a fully human PCSK9 monoclonal antibody, in high cardiovascular risk patients with poorly controlled hypercholesterolemia on maximally tolerated doses of statins: rationale and design of the ODYSSEY COMBO I and II trials. *BMC cardiovascular disorders* 2014; 14: 121.
18. Kereiakes DJ, Efficacy and safety of alirocumab in high cardiovascular risk patients with suboptimally controlled hypercholesterolemia on maximally tolerated doses of statins: the ODYSSEY COMBO I study. *Circulation* 2014.
19. C.P. C, Efficacy and safety of alirocumab in high cardiovascular risk patients with inadequately controlled hypercholesterolemia on maximally tolerated daily statin: results from the ODYSSEY COMBO II. *Eur Heart J* 2014.
20. Koren MJ, Lundqvist P, Bolognese M, et al., Anti-PCSK9 monotherapy for hypercholesterolemia: the MENDEL-2 randomized, controlled phase III clinical trial of evolocumab. *Journal of the American College of Cardiology* 2014; 63(23): 2531-2540.
21. Blom DJ, Hala T, Bolognese M, et al., A 52-week placebo-controlled trial of evolocumab in hyperlipidemia. *The New England journal of medicine* 2014; 370(19): 1809-1819.
22. Robinson JG, Nedergaard BS, Rogers WJ, et al., Effect of evolocumab or ezetimibe added to moderate- or high-intensity statin therapy on LDL-C lowering in patients with hypercholesterolemia: the LAPLACE-2 randomized clinical trial. *Jama* 2014; 311(18): 1870-1882.
23. Stroes E, Colquhoun D, Sullivan D, et al., Anti-PCSK9 antibody effectively lowers cholesterol in patients with statin intolerance: the GAUSS-2 randomized, placebo-controlled phase 3 clinical trial of evolocumab. *Journal of the American College of Cardiology* 2014; 63(23): 2541-2548.
24. Raal FJ, Stein EA, Dufour R, et al., PCSK9 inhibition with evolocumab (AMG 145) in heterozygous familial hypercholesterolemia (RUTHERFORD-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2015; 385(9965): 331-340.
25. Raal FJ, Honarpour N, Blom DJ, et al., Inhibition of PCSK9 with evolocumab in homozygous familial hypercholesterolemia (TESLA Part B): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2015; 385(9965): 341-350.
26. Weinreich M and Frishman WH, Antihyperlipidemic therapies targeting PCSK9. *Cardiology in review* 2014; 22(3): 140-146.
27. BM G, Effects of 12 weeks of treatment with RN316 (PF-04950615), a humanized IgG2 $\Delta$ a monoclonal antibody binding proprotein convertase subtilisin kexin type 9, in hypercholesterolemic subjects on high and maximal dose statins. *Circulation* 2012.
28. Ballantyne CM, Neutel J, Cropp A, et al., Results of bococizumab, a monoclonal antibody against proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, from a randomized, placebo-controlled, dose-ranging study in statin-treated subjects with hypercholesterolemia. *The American journal of*

- cardiology 2015; 115(9): 1212-1221.
29. Navarese EP, Kolodziejczak M, Schulze V, et al., Effects of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Antibodies in Adults With Hypercholesterolemia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Annals of internal medicine* 2015.
  30. Robinson JG, Farnier M, Krempf M, et al., Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *The New England journal of medicine* 2015; 372(16): 1489-1499.
  31. Sabatine MS, Giugliano RP, Wiviott SD, et al., Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *The New England journal of medicine* 2015; 372(16): 1500-1509.
  32. Swiger KJ and Martin SS, PCSK9 Inhibitors and Neurocognitive Adverse Events: Exploring the FDA Directive and a Proposal for N-of-1 Trials. *Drug safety* 2015; 38(6): 519-526.
  33. Poirier S, Mayer G, Benjannet S, et al., The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2. *The Journal of biological chemistry* 2008; 283(4): 2363-2372.
  34. Rashid S, Tavori H, Brown PE, et al., Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 promotes intestinal overproduction of triglyceride-rich apolipoprotein B lipoproteins through both low-density lipoprotein receptor-dependent and - independent mechanisms. *Circulation* 2014; 130(5): 431-441.
  35. Le May C, Kourimate S, Langhi C, et al., Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2009; 29(5): 684-690.
  36. Rashid S, Curtis DE, Garuti R, et al., Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102(15): 5374-5379.
  37. Gaudet D, Kereiakes DJ, McKenney JM, et al., Effect of alirocumab, a monoclonal proprotein convertase subtilisin/kexin 9 antibody, on lipoprotein(a) concentrations (a pooled analysis of 150 mg every two weeks dosing from phase 2 trials). *The American journal of cardiology* 2014; 114(5): 711-715.
  38. Raal FJ, Giugliano RP, Sabatine MS, et al., Reduction in lipoprotein(a) with PCSK9 monoclonal antibody evolocumab (AMG 145): a pooled analysis of more than 1,300 patients in 4 phase II trials. *Journal of the American College of Cardiology* 2014; 63(13): 1278-1288.
  39. Stein EA, Dufour R, Gagne C, et al., Apolipoprotein B synthesis inhibition with mipomersen in heterozygous familial hypercholesterolemia: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial to assess efficacy and safety as add-on therapy in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2012; 126(19): 2283-2292.
  40. Romagnuolo R, Scipione CA, Boffa MB, et al., Lipoprotein(a) Catabolism Is Regulated by Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 through the Low Density Lipoprotein Receptor. *The Journal of biological chemistry* 2015; 290(18): 11649-11662.
  41. Stein EA, Honarpour N, Wasserman SM, et al., Effect of the proprotein convertase subtilisin/kexin 9 monoclonal antibody, AMG 145, in homozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation* 2013; 128(19): 2113-2120.
  42. Tavori H, Giunzioni I, Linton MF, et al., Loss of plasma proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) after lipoprotein apheresis. *Circulation research* 2013; 113(12): 1290-1295.