

Znaczenie glikoproteiny PCSK9 w farmakoterapii hipercholesterolemii rodzinnej

Role of glycoprotein PCSK9 in the treatment of familial hypercholesterolemia

Michał Pstrągowski, Magdalena Bujalska-Zadrożny, Krystyna Cegielska-Perun

Zakład Farmakodynamiki Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

STRESZCZENIE

Wykazano, że nadmierna ekspresja konwertazy proproteinowej jest silnie skorelowana ze zmniejszoną gęstością receptorów lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) na powierzchni komórek, a tym samym przyczynia się do wzrostu ryzyka wystąpienia incydentów wieńcowych. Inhibicja białka jest więc obiecującą strategią terapeutyczną między w terapii innymi hipercholesterolemii rodzinnej. Oprócz związków drobnocząsteczkowych duże powinowactwo do białka wykazują liczne przeciwciała monoklonalne. Wstępne wyniki badań sugerują, że SAR236553/REGN726, J16 i mAb1 nie tylko istotnie zmniejszają stężenie cholesterolu frakcji LDL, ale można je również wykorzystać w leczeniu skojarzonym ze statynami. Co więcej, zastosowanie niektórych z nich (AMG145) pozwala na znaczne obniżenie ryzyka wystąpienia miopatii u chorych przyjmujących wcześniej inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A.

Choroby Serca i Naczyń 2013, 10 (2), 72–77

Słowa kluczowe: PCSK9, hipercholesterolemia rodzinna, przeciwciało monoklonalne, SAR236553/REGN726, AMG145, receptory LDL, miopatia

ABSTRACT

It has been shown that subtilisin-like proprotein convertase expression seems to be strongly correlated with low-density lipoprotein (LDL)-receptors decreased on the cells surface. Consequently, it contributes to increase of coronary incidents risks. Currently, the protein inhibition is therefore one of the most promising therapeutic strategy which can be used in the treatment of familial hypercholesterolemia. Apart from small-molecule lead compounds, the high-affinity protein binding ligands are some of monoclonal antibodies. The preliminary studies suggest that SAR236553/REGN726, J16 and mAb1 reduce significantly LDL cholesterol and can be used in the combination with statins. Moreover, in case of patients taking hydroxy-methylglutaryl coenzyme A inhibitors, the administration of AMG145 is not related with a high risk of some adverse drug reactions (especially myopathy).

Choroby Serca i Naczyń 2013, 10 (2), 72–77

Key words: PCSK9, familial hypercholesterolemia, monoclonal antibody, SAR236553/REGN726, AMG145, LDL-receptors, myopathy

Adres do korespondencji:

mgr farm. Michał Pstrągowski
Zakład Farmakodynamiki
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Krakowskie Przedmieście 26/28, 00–927 Warszawa
e-mail: pstrag21@op.pl

WPROWADZENIE

Uwarunkowane genetycznie, istotne zwiększenie osoczowego stężenia cholesterolu frakcji LDL (*low-density lipoprotein*) jest nieprawidłowością charakterystyczną dla wielu typów zaburzeń metabolicznych. Określenie to obejmuje nie tylko schorzenia dziedziczne w sposób jednogenowy, ale także choroby uwarunkowane aktywnością większej liczby czynników. Homozygotyczna hipercholesterolemia rodzinna (FH, *familiar hypercholesterolemia*) występuje niezwykle rzadko — w populacji krajów rozwiniętych może wystąpić u jednej osoby na milion. Znacznie powszechniejsza jest natomiast zachorowalność na heterozygotyczną postać FH. U większości pacjentów dochodzi wówczas do 2–3-krotnego zwiększenia stężenia cholesterolu całkowitego oraz cholesterolu frakcji LDL. Co ważne, stężenia cholesterolu frakcji HDL (*high-density lipoprotein*), cholesterolu frakcji VLDL (*very low-density lipoprotein*) i triglicerydów z reguły pozostają na niezmiennym poziomie [1, 2].

Konsekwencja zaburzeń to przede wszystkim szybkie odkładanie się cholesterolu w ściankach naczyń krwionośnych, co znacząco zwiększa ryzyko przedwczesnego rozwoju choroby niedokrwiennej serca (IHD, *ischaemic heart disease*). Dane epidemiologiczne wyraźnie sugerują, że jej nasilone objawy występują znacznie wcześniej u chorych z FH. Oczywiście ich częstość oraz natężenie zależą także od stylu życia i dodatkowych czynników ryzyka.

Wśród czynników diagnostycznych, wskazujących na rozwój heterozygotycznej FH, na pierwszy plan wysuwa się przede wszystkim pojawienie się specyficznych żółtaków w skórze i ścięgnach. Ocenia się, że te charakterystyczne objawy, dotyczące głównie osób w 3. dekadzie życia, z reguły obejmują ścięgno Achillesa, kończynę górną oraz okolice grzbietu [2].

GENETYCZNE PODŁOŻE ROZWOJU SCHORZENIA

Głównym podłożem rozwoju dziedzicznej w sposób autosomalny dominujący rodzinnej hipercholesterolemii (AD FH, *autosomal dominant familiar hypercholesterolemia*) jest mutacja genu receptora dla LDL (LDLR, *low-density lipoprotein receptor*), a także strukturalne nieprawidłowości w obrębie apolipoproteiny B-100 (FDB, *familial defective Apo B-100*) uwarunkowane mutacją genu kodującego ten polipeptyd. Częstość występowania heterozygot FH i FDB w populacji Europejczyków wynosi, odpowiednio, od 1/500 do 1/1000 żywych urodzeń [2, 3]. Trzecim czynnikiem związanym z rozwojem FH jest mutacja zidentyfikowanego w 2003 roku przez Abifadel i wsp. genu

kodującego PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin kexin 9*). Ocenia się, że występuje on rzadziej niż u jednego chorego na 2500. Mimo to negatywny wpływ tej glikoproteiny na rozwój FH nadal stanowi przedmiot intensywnej dyskusji. Wykazano bowiem między innymi, że u pacjentów ze stwierdzonym współistnieniem heterozygotycznych mutacji zarówno w obrębie LDLR, jak i PCSK9 odnotowano 2-krotne zwiększenie stężenia osoczowej frakcji LDL w porównaniu z grupą kontrolną, u której defekty te wystąpiły pojedynczo [3, 4].

Zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 19 gen dla LDLR określa się również mianem tak zwanego *housekeeping gene*, co oznacza, że w tkankach ulega on nieprzerwanej ekspresji, a z jego transkryptów powstaje właściwa proteina. Proces ten jest koordynowany przez sprzężenie zwrotne ujemne kontrolowane aktywnością niektórych związków o budowie steroidowej. Co ciekawe, duża część fragmentu genu dla LDLR wykazuje daleko idącą homologię do eksonów innych genów, między innymi prekursora dla nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF, *endothelial growth factor*), białek układu dopełnicza czy czynników warunkujących przebieg hemostazy [5].

Sam LDLR jest transbłonową proteiną złożoną z 839 aminokwasów połączonych wiązaniem glikozydowym z oligocukrami. Proces glikozylacji niedojrzałego białka zachodzi najpierw w obrębie retikulum endoplazmatycznego, a następnie w aparatach Golgiego. Jak dotąd, zidentyfikowano dwa ligandy dla receptora: apolipoproteinę B-100 oraz apolipoproteinę E, stanowiące integralną część VLDL. Przyjmuje się, że niemal 75% cholesterolu całkowitego krążącego we krwi jest transportowane przez LDL, a około 70% tych cząsteczek wychwytyują receptory zlokalizowane na powierzchni komórek. Nie bez powodu więc ocenia się, że liczba LDLR jest silnie skorelowana z zapotrzebowaniem tkanek na cholesterol [4, 6].

Apolipoproteina B-100 jest najdłuższym, poznanym dotychczas łańcuchem polipeptydowym. Składa się z 4536 aminokwasów, a jej masa cząsteczkowa wynosi około 550 kDa. Odpowiadający za proces kodowania białka gen *APOB* jest położony na krótkim ramieniu chromosomu 2. Na jego matrycy powstają dwie równorzędne formy apolipoproteiny B: produkowana w jelicie i zlokalizowana w chylomikronach apolipoproteina B-48 oraz apolipoproteina B-100 wchodząca w skład zarówno VLDL, jak i aterogennej cząsteczki LDL. Potwierdzono jednak, że LDLR łączy się wyłącznie z tą ostatnią z uwagi na fakt, że apolipoproteina B-48 nie zawiera domeny odpowiadającej za interakcję z LDLR [2, 7].

Należy zaznaczyć, że obecnie wiele uwagi poświęca się czynnikom częściowo lub całkowicie hamującym tego typu oddziaływania. Do tej pory udało się zidentyfikować szeroką gamę mutacji w obrębie genu dla LDLR i tylko siedem niekorzystnych zmian w obrębie genu *APOB*. Przyjmuje się jednak, że te ostatnie także mogą się przyczynić do rozwoju FH. Obraz kliniczny schorzenia z reguły jest wówczas nieco łagodniejszy [2, 4].

GLIKOPROTEINA PCSK9

Zaliczana do szerokiej klasy osoczowych proteaz serynowych glikoproteina PCSK9, w piśmiennictwie określana również jako konwertaza proproteinowa, poprzez wiązanie się z wątrobowymi receptorami LDL wyraźnie determinuje stężenie krążącego cholesterolu frakcji LDL [2]. Już teraz przyjmuje się, że może to być nowy, obiecujący punkt uchwytu działania związków skutecznych wobec niektórych postaci zaburzeń lipidowych. Oprócz hepatocytów, najintensywniejszą ekspresję białka odnotowano w komórkach jelita cienkiego, a ponadto jego znacznie mniejsze ilości także w grasicy, płucach, nerkach i śledzionie [8].

Struktura białka jest oparta na 30-aminokwasowej sekwencji sygnałowej, po której następuje domena katalityczna oraz bogata w cysteinę i histydynę tak zwana domena C-końca. Sama glikoproteina jest zsyntezowana w postaci nieaktywnego, rozpuszczalnego zymogenu o masie około 72 kDa. Dopiero złożone procesy wewnątrzcząsteczkowej autokatalizy zachodzące w retikulum endoplazmatycznym przyczyniły się między innymi do oddzielenia, a następnie ponownego związania się prodomeny z domeną katalityczną. Bezpośrednią konsekwencją tych molekularnych przekształceń jest nie tylko zwiększenie masy (do 63 kDa) i uzyskanie pełnej aktywności biologicznej przez białko, ale także jego szybki transport i sekrecja do przestrzeni międzykomórkowej. Obecnie wiele uwagi poświęca się także modyfikacjom potranslacyjnym glikoproteiny. Przyjmuje się, że — analogicznie jak w przypadku części poznanych polipeptydów zaliczanych do rodziny proteaz serynowych — istotną rolę może odgrywać katalityczne dołączanie reszt sulfonowych do tyrozyny zachodzące przy aktywnym wsparciu struktur Golgiego [9].

Związanie się konwertazy proproteinowej z LDLR przynosi analogiczne rezultaty, jak w przypadku przyłączenia cząsteczki LDL. Oddziaływanie z sekwencją EGF-A receptora początkowo przyczynia się do jego szybkiej internalizacji. Następnie dochodzi do redystrybucji i de-

gradacji białka w lizosomach. Warto nadmienić, że powinowactwo proteazy do fragmentu EGF uzależnione jest między innymi od pH środowiska — wykazano, że w tym przypadku nawet niewielkie zakwaszenie ustroju istotnie zwiększa oddziaływanie między proteinami [10]. Glikoproteina PCSK9 wykorzystuje także alternatywny mechanizm aktywności biologicznej. Łącząc się z receptorem, który wcześniej uległ internalizacji i interakcji z LDL, bezpośrednio przyczynia się do zmniejszenia gęstości LDLR na powierzchni komórek. Pociąga to za sobą jedną, niezwykle kluczową z punktu widzenia farmakoterapii zależność — nadmierna ekspresja PCSK9 jest ściśle skorelowana ze wzrostem stężenia LDL w osoczu, a tym samym także ze zwiększoną częstością występowania poważnych incydentów wieńcowych. Ocenia się, że schemat może zostać wykorzystany w projektowaniu związków mogących skutecznie zahamować wielokierunkową aktywność niektórych postaci konwertazy proproteinowej [11].

Do tej pory potwierdzono istnienie kilku typów heterozygotycznych mutacji w obrębie genu kodującego PCSK9. Znaczna liczba tych negatywnych zmian (m.in. *S127R*, *F216L*, *D374Y*), obok defektów w obrębie *LDLR* i *APOB*, jest uznawana za kluczowy czynnik warunkujący wystąpienie objawów FH. Część mutacji nie wpływa jednak istotnie na intensywność degradacji LDLR, co tym samym idzie, nie pociąga za sobą ryzyka wystąpienia poważniejszych zaburzeń [12]. Należy również podkreślić, że poszczególne mutanty mogą znacznie się różnić stopniem powinowactwa do sekwencji EGF-A, a także wrażliwością wobec PC5/6A i furyny — enzymów z klasy konwertaz odpowiadających za degradację białka. Niektóre zmutowane formy białka łączą się również w złożone struktury homodimeryczne, co przyczynia się do nasilonego rozkładu zinternalizowanych LDLR [4, 12].

PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE PRZECIWKO PCSK9

Wyrażna korelacja między aktywnością konwertazy proproteinowej a stężeniem cholesterolu frakcji LDL w ustroju skłoniła do poszukiwania potencjalnych leków, które w przyszłości mogą zostać z powodzeniem wykorzystane w leczeniu zaburzeń lipidowych. Obok drobnocząsteczkowych antagonistów PCSK9 (m.in. SX-PCSK9) oraz metod opartych na epigenetycznych procesach regulacji genów (tzw. *gene silencing*) na dość zaawansowanym etapie badań znajdują się obecnie niektóre przeciwciała monoklonalne (np. SAR236553/REGN727, AMG145, RN316, LGT209, 1B20, mAb1). Jak się okazało, w niektórych przypadkach podawanie homogenicznych

populacji przeciwciał — zarówno w monoterapii, jak i w leczeniu skojarzonym — istotnie wpływa na aktywność zmutowanych form PCSK9, a tym samym zmniejsza stężenie cholesterolu frakcji LDL [9, 11, 13, 14].

Przeciwciało SAR236553/REGN727

Szczególnie perspektywiczne może się okazać zastosowanie przeciwciała SAR236553/REGN727. Potwierdza to kliniczna ocena McKenneya i wsp. [15], którzy w ostatnim czasie przeprowadzili szczegółową obserwację 182 chorych z heterozygotyczną FH, regularnie przyjmujących atorwastatynę w dostępnych dawkach terapeutycznych (10 mg, 20 mg i 40 mg). W trzech analizowanych grupach badawczych stężenie cholesterolu frakcji LDL wynosiło 100 mg/dl lub więcej. Pacjenci co 2 tygodnie stosowali podskórne iniekcje zawierające REGN727 w dawce 50 mg, 100 mg lub 150 mg. W dwóch pozostałych grupach chorych wdrożono odmienny schemat podawania przeciwciała: REGN727 stosowano w zwiększonych dawkach (200 mg i 400 mg) raz na 4 tygodnie. Obserwacje dowiodły, że włączenie do terapii atorwastatyną badanego przeciwciała monoklonalnego przyczyniło się do istotnego zmniejszenia wartości cholesterolu frakcji LDL w osoczu. Kliniczne efekty badania korelowały z dawką leku, oscylując od 39-procentowej redukcji stężenia cholesterolu frakcji LDL przy dawce 50 mg do 72-procentowej redukcji przy dawce 150 mg (tab. 1). W 12. tygodniu oceny wszyscy pacjenci osiągnęli prawidłowe stężenie cholesterolu frakcji LDL (< 70 mg/ml). Co więcej, potwierdzono, że częstsze iniekcje REGN727, co 2 tygodnie, okazały się skuteczniejsze niż dawkowanie przeciwciała co 4 tygodnie [15].

Doniesienia te zdają się potwierdzać także wyniki wcześniejszych badań Steina i wsp. [16] przeprowadzonych w grupie zdrowych osób oraz chorych leczonych

statynami w skojarzeniu z ezetimibem. W tym przypadku odnotowano zależne od dawki, wyraźne zmniejszenie stężenia cholesterolu LDL o, odpowiednio, 39,2%, 53,7% i 61,0% w porównaniu z placebo [16]. Zarówno obserwacje McKenneya i wsp. [15], jak i Steina i wsp. [16] zwracają ponadto uwagę na dobrą tolerancję przeciwciała i stosunkowo wysoki wskaźnik bezpieczeństwa związany z podawaniem przeciwciała. Poważne działania niepożądane skutkujące przerwaniem terapii wystąpiły u 3 badanych pacjentów. U jednego z nich, po uprzedniej biopsji, rozpoznano leukocytoklastyczne zapalenie naczyń. Zdarzenie to wydaje się wiązać ze stosowaniem REGN727 [15, 16].

Przeciwciało AMG145

Homogeniczne populacje przeciwciał badane są także pod kątem chorych, u których stwierdzono dolegliwości ze strony układu mięśniowego związane z niewłaściwą tolerancją inhibitorów HMG-CoA. Objawy miopatii występują u 10–15% pacjentów regularnie stosujących statyny. Klinicznie manifestują się przede wszystkim jako ból i znaczne osłabienie siły oraz wytrzymałości stawów i mięśni szkieletowych. Mimo to są uważane za jedno z mniej poważnych działań niepożądanych, w odróżnieniu od stosunkowo rzadkiej, ale potencjalnie śmiertelnej i z reguły przebiegającej w sposób piorunujący rhabdomyolizy [17]. Efektem poszukiwań związków wykazujących potencjalną skuteczność u chorych nietolerujących statyn jest AMG145 — ludzkie przeciwciało, którego głównym punktem uchwytu działania, podobnie jak w przypadku REGN727, jest konwertaza proproteinowa.

Ocena Sullivana i wsp. [18], przeprowadzona w 236-osobowej grupie pacjentów z objawami ze strony układu mięśniowego, wykazała, że podawany co 4 tygodnie w postaci podskórnych iniekcji AMG145 istotnie

Tabela 1. Średnia zmiana stężenia cholesterolu frakcji LDL po zastosowaniu REGN727 (na podstawie [15])

Dawkowanie	Wyjściowe stężenie cholesterolu frakcji LDL [mg/dl]	Średnia zmiana stężenia cholesterolu frakcji LDL (%)
Placebo	130,2	-5,1
50 mg REGN727 co 2 tygodnie	123,2	-39,6
100 mg REGN727 co 2 tygodnie	127,0	-64,2
150 mg REGN727 co 2 tygodnie	123,9	-72,4
200 mg REGN727 co 4 tygodnie	128,2	-43,2
300 mg REGN727 co 4 tygodnie	131,6	-47,7

LDL (*low-density lipoprotein*) — lipoproteiny o niskiej gęstości

Tabela 2. Średnia zmiana stężenia cholesterolu frakcji LDL po zastosowaniu AMG145 w monoterapii i w terapii skojarzonej z ezetimibem (na podstawie [18])

Dawkowanie	Wyjściowe stężenie cholesterolu frakcji LDL [mg/dl]	Średnia zmiana stężenia cholesterolu frakcji LDL (%)
Placebo	193,0	-15,0
280 mg AMG145	193,0	-41,0
350 mg AMG145	193,0	-43,0
420 mg AMG145	193,0	-51,0
420 mg AMG145 + ezetimib	193,0	-63,0

LDL (*low-density lipoprotein*) — lipoproteiny o niskiej gęstości

zmniejsza stężenie osoczowej frakcji LDL. Rezultaty kliniczne badania zależały od dawki (280 mg, 350 mg i 420 mg) oraz skojarzenia przeciwciała z ezetimibem (tab. 2). W tym drugim przypadku skuteczność terapeutyczna takiego połączenia wyraźnie przewyższała efekty monoterapii. Ocena Sullivana obejmowała również analizę porównawczą profilu bezpieczeństwa, szczególnie w kontekście działania niektórych statyn. Z jednej strony okazało się, że zastosowanie AMG145, choć nie pozwala na całkowite wyeliminowanie ryzyka rozwoju miopatii, wiąże się ze znacznie niższym prawdopodobieństwem wystąpienia silnych bólów mięśniowych. Z drugiej jednak strony u kilku chorych odnotowano objawy ostrego zapalenia trzustki i choroby wieńcowej, co skłania do przeprowadzenia kolejnych badań potwierdzających częstość i natężenie poważnych działań niepożądanych [18].

BADANIA PRZEDKLINICZNE

Na etapie oceny przedklinicznej jest wiele innych przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko niektórym formom PCSK9. Z domeną katalityczną glikoproteiny odpowiedzialną za wiązanie się z LDLR skutecznie wiąże się między innymi mAb1. Wiadomo, że przeciwciało wiąże się z konwertazą proproteinową, przerywając interakcję PCSK9 z LDLR, co prowadzi do wzrostu ekspresji wątrobowych LDLR, a więc nasila wychwyt LDL z osocza. W badaniach na zwierzętach wykazano, że jednorazowe podanie mAb1 znacząco obniża wartość cholesterolu całkowitego w surowicy. Efekt tego działania pojawiał się stosunkowo szybko (do 8 h) i utrzymywał nawet do 10 dni. Co więcej, Chan i wsp. [13] zaobserwowali, że łączne podanie przeciwciała monoklonalnego mAb1 i lowastatyny zmiennie zwiększa ekspresję LDLR w komórkach wątroby w porównaniu z podaniem samego przeciwciała lub inhibitora HMG-CoA. Autorzy oceny sugerują, że w niedalekiej przyszłości mAb1 może

stanowić nowy cel badawczy w leczeniu FH albo uzupełniać terapię statynami u pacjentów źle tolerujących duże dawki tych leków [13].

Zbliżone rezultaty przyniosły badania nad J16 — humanizowanym przeciwciałem łączącym się z domeną PCSK9 bezpośrednio odpowiedzialną z interakcją z fragmentem EGF LDLR. Ni i wsp. [19] w badaniach na zwierzętach zaobserwowali, że nawet pojedyncza iniekcja związku zmniejsza stężenie cholesterolu frakcji LDL o niemal 70%. Co więcej, podobne efekty kliniczne uzyskano na modelach zwierzęcych z objawami hipercholesterolemii. Obecnie ocena jest na zaawansowanym etapie skorelowania skuteczności J16 z aktywnością wybranych inhibitorów HMG-CoA. Wstępne wyniki są niezwykle obiecujące — w swoich badaniach Ni i wsp. [19] wykazali, że jednoczesne podanie przeciwciała i simwastatyny skutkuje zmniejszeniem stężenia cholesterolu frakcji LDL o 65% [19].

PIŚMIENNICTWO

1. Khachadurian A.K., Uthman S.M. Experiences with the homozygous cases of familial hypercholesterolemia. A report of 52 patients. *Nutr. Metab.* 1973; 15: 132–140.
2. Broncel M. Aktualne kryteria rozpoznawania dyslipidemii. Docelowe stężenia lipidów w chorobach serca i naczyń. *Kardiologia Oparta na Faktach* 2010; 1: 15–28.
3. Aalst-Coben E.S., Jansen A.C., Tranch M.W. Diagnosis familial hypercholesterolemia the relevance of genetic testing. *Eur. Heart J.* 2006; 27: 2240–2246.
4. Lewartowski B. PCSK9 — początek przełomu w zapobieganiu i leczeniu miażdżycy? *Kardiol. Pol.* 2009; 67: 7.
5. Südhof T.C., Van der Westhuyzen D.R., Goldstein J.L. Three direct repeats and a TATA-like sequence are required for regulated expression of the human low density lipoprotein receptor gene. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 10 773–10 779.
6. Mehta K.D., Chang R., Norman J. Chiloscyllium plagiosum low-density lipoprotein receptor: evolutionary conservation of five different functional domains. *J. Mol. Evol.* 1996; 42: 264–272.
7. Yang Y., Ballatori N., Smith H.C. Apolipoprotein B mRNA editing and the reduction in synthesis and secretion of the atherogenic risk factor, apolipoprotein B100 can be effectively targeted through TAT-mediated protein transduction. *Mol. Pharmacol.* 2002; 61: 269–276.

8. Seidah N.G., Benjannet S., Wickham L. i wsp. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 928–933.
9. Horton J.D., Cohen J.C., Hobbs H.H. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 2007; 32: 71–77.
10. Fisher T.S., Lo Surdo P., Pandit S. Effects of pH and low density lipoprotein (LDL) on PCSK9-dependent LDL receptor regulation. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 20 502–20 512.
11. Zaid A., Roubtsova A., Essalmani R. Protein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology* 2008; 48: 646–654.
12. Pandit S., Wisniewski D., Santoro J.C. Functional analysis of sites within PCSK9 responsible for hypercholesterolemia. *J. Lipid. Res.* 2008; 49: 1333–1343.
13. Chan J.C., Piper D.E., Cao Q. A proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 neutralizing antibody reduces serum cholesterol in mice and nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009; 106: 9820–9825.
14. Koren M.J., Scott R., Kim J.B., Knusel B. Efficacy, safety, and tolerability of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 as monotherapy in patients with hypercholesterolaemia (MENDEL): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet* 2012; 380: 1995–2006.
15. McKenney J.M., Koren M.J., Kereiakes D.J. Safety and efficacy of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease, SAR236553/REGN727, in patients with primary hypercholesterolemia receiving ongoing stable atorvastatin therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012; 59: 2344–2353.
16. Stein E.A., Mellis S., Yancopoulos G.D. Effect of a monoclonal antibody to PCSK9 on LDL cholesterol. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366: 1108–1118.
17. Sitniewska E., Gajewska H., Kinalska I. Terapia statynami jako cel redukcji ryzyka sercowo-naczyniowego u pacjentów z cukrzycą. *Przegl. Kardiologia-betol.* 2009; 4: 97–105.
18. Sullivan D., Olsson A.G., Scott R. Effect of a monoclonal antibody to PCSK9 on low-density lipoprotein cholesterol levels in statin-intolerant patients: the GAUSS randomized trial. *JAMA* 2012; 308: 2497–2506.
19. Liang H., Chaparro-Riggers J., Strop P. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 antagonism reduces low-density lipoprotein cholesterol in statin-treated hypercholesterolemic nonhuman primates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012; 340: 228–236.