

PCSK9

y su importancia en el metabolismo del C-LDL

M^a DEL PILAR VELASCO PANADERO

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Y BIOLOGÍA MOLECULAR

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

CURSO 2017/2018

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA
TRABAJO FIN DE GRADO
GRADO EN FARMACIA



LA PCSK9 Y SU IMPORTANCIA EN EL METABOLISMO DE LAS LDL

Autora: M^a del Pilar Velasco Panadero

Tutora: Consuelo Santa María Pérez

Tipología del trabajo: Revisión
bibliográfica

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla

RESUMEN

La PCSK9, proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9, es una proteína que se une a los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLr), y los acompaña al lisosoma para su destrucción. En consecuencia, el número de LDLr disminuye y el aclaramiento del colesterol unido a LDL (LDL-c) se reduce, produciéndose en muchos casos hipercolesterolemia.

Se han descrito mutaciones con ganancia de función en PCSK9 que cursan con un notable incremento en la concentración de LDL-c y mutaciones con pérdida de función, que se acompañan de modestas reducciones de LDL-c y bajas tasas de enfermedad cardíaca coronaria.

Por ello, PCSK9 se ha convertido en una prometedora diana terapéutica para disminuir la hipercolesterolemia.

En el estudio más reciente publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se indica que la mayoría de personas que padecen colesterol elevado en sangre no están recibiendo el tratamiento adecuado para reducir el riesgo de sufrir un accidente cardiovascular. Esto, sumado a que las principales causas de mortalidad en el mundo son la cardiopatía isquémica y el accidente cerebrovascular. Ambas ocasionaron 15 millones de defunciones en 2015 y han sido las principales causas de mortalidad durante los últimos 15 años.

La PCSK9, se convierte en una diana fundamental para aumentar el arsenal terapéutico en el tratamiento de este problema mundial. En esta revisión se aportan los datos sobre la trayectoria que ha seguido la búsqueda de estos, necesarios, nuevos fármacos. Desde las primeras pruebas en animales hasta los inhibidores más selectivos y eficaces que están hoy día en uso.

PALABRAS CLAVE:

PCSK9, Pro-proteína convertasa subtilisina kexina tipo 9, NARC-1, Mutaciones PCSK9, Hipercolesterolemia familiar, Inhibidores PCSK9.

INDICE

RESUMEN.....	iii
PALABRAS CLAVE:	iii
ABREVIATURAS.....	v
1. OBJETIVOS:.....	1
2. METODOLOGÍA:.....	1
3. INTRODUCCIÓN:.....	2
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:.....	3
4.1. ANTECEDENTES:	3
4.2. FUNCIÓN Y REGULACIÓN GÉNICA DE PCSK9.....	6
4.2.1. Regulación de la expresión génica de PCSK9	8
4.3. MUTACIONES PCSK9	8
4.3.1. Mutaciones con ganancia de función.....	8
4.3.2. Mutaciones con pérdida de función	9
4.4. ESTRUCTURA CRISTALINA DE PCSK9	12
4.4.1. Estructura cristalina y mutaciones:	13
4.5. PRUEBA DE LA INHIBICIÓN DE PCSK9 EN ANIMALES	16
4.5.1. Prueba en ratones	16
4.5.2. Prueba en primates no humanos	18
4.6. PRIMERA PRUEBA DEL FARMACO EN HUMANOS.....	19
4.6.1. Dosis única.....	20
4.6.2. Dosis múltiple.....	21
4.7. FÁRMACOS INHIBIDORES DE LA PCSK9.....	23
4.7.1. Alirocumab	23
4.7.2. Evolocumab.....	27
4.7.3. Comparación alirocumab vs evolocumab	28
4.7.4. Bococizumab	30
4.8. NUEVAS VÍAS DE INVESTIGACIÓN DE PCSK9.....	31
5. CONCLUSIONES	33
6. BIBLIOGRAFÍA.....	34

ABREVIATURAS

ADH: Hipercolesterolemia Autosomial Dominante.

ADN-m: Ácido Desoxirribonucleico mensajero.

ApoB: Apolipoproteína B.

Apobec1: Apolipoproteína B enzima editora del ARNm, polipetidasa 1.

ASO: Oligonucleótidos Anti Sentido.

CV: Cardiovascular.

ECV: Enfermedad Cardiovascular.

EGF-A: Factor de crecimiento epidérmico.

HDL-c: Colesterol unido a lipoproteína de alta densidad.

HF: Hipercolesterolemia Familiar.

HeFH: Hipercolesterolemia Familiar Heterocigótica.

HoFH: Hipercolesterolemia Familiar Homocigótica.

LDL-c: Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad.

LDLR: Receptores de lipoproteínas de baja densidad.

LNP: Nanopartícula lipidoide.

NARC-1: Neural Apoptosis-Regulated Convertase 1.

PCSK9: Pro-proteína convertasa subtilisina kexina tipo 9.

PKs: Proteínasa K-like.

PNH: Primates no humanos.

SiRNA: Pequeños fragmentos activos de ARN de interferencia.

SKI-1: Src Kinase Inhibitor I.

SREBP-1/2: Reguladores de esteroides proteína 1/2 de unión a elementos.

TG: Triglicéridos.

1. OBJETIVOS:

- 1- Realizar una revisión bibliográfica de los conocimientos actuales en relación a PCSK9.
- 2- Estudiar el mecanismo de acción de PCSK9 dentro del organismo.
- 3- Exponer el paso desde proteína desconocida a diana terapéutica.
- 4- Revisar los estudios actuales de la terapia farmacológica de inhibidores de PCSK9.
- 5- Describir las perspectivas futuras del estudio de PCSK9.

2. METODOLOGÍA:

Se ha llevado a cabo una extensa revisión bibliográfica con la finalidad de resumir los resultados de los estudios existentes en la literatura científica sobre las PCSK9 y su aplicación a la industria farmacéutica.

El proceso de documentación de este trabajo fin de grado se ha realizado en varias etapas. En primer lugar, se realizó una búsqueda que permitió una primera aproximación al tema objeto de estudio centrado en los trabajos de revisión anteriormente publicados y que permitió definir las palabras clave para una segunda búsqueda más específica. Como palabras clave para la primera búsqueda se eligieron las siguientes: PCSK9, NARC-1 y inhibidores PCSK9. Por último, se realizó una búsqueda más exhaustiva, para intentar localizar la bibliografía citada en los artículos seleccionados que consideramos de especial interés.

Las búsquedas se realizaron en las siguientes bases de datos: PubMed y Medline. Una vez finalizada e identificados los artículos más relevantes para el tema de la revisión, se procedió a una selección de los mismos para incluirlos en la bibliografía de este trabajo fin de grado.

Entre los autores con más experiencia en el descubrimiento de esta proteína se encuentra **Nabil G. Seidah** que cuenta con 97 entradas y es el autor con las publicaciones más interesantes e innovadoras. Este autor realizó su labor de investigación como Director de la Unidad de Investigación de Neuroendocrinología Bioquímica del IRCM (Instituto de Investigación Científica de Montreal).

Cabe destacar también la revisión realizada por **Evan A. Stein**, en 2012 sobre la primera aplicación terapéutica de los inhibidores de PCSK9 en humanos, en el Centro de Investigación Metabólica y de Arterioesclerosis en Cincinnati, Ohio, Estados Unidos.

A nivel nacional, **Juan Pedro-Botet**, perteneciente al departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, ha realizado las revisiones bibliográficas más importantes en castellano.

3. INTRODUCCIÓN:

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) ateroscleróticas son la principal causa de morbi-mortalidad a nivel mundial. La innegable relación directa, demostrada, entre el colesterol unido a las lipoproteínas de baja densidad (LDL-c) y las ECV, hace que los esfuerzos destinados a la modulación y regulación de esta fracción lipoproteica tengan un rol central en la prevención de la aterosclerosis.

La persistencia de eventos cardiovasculares a pesar de la utilización de estatinas, la intolerancia y los efectos adversos a éstas, y los trastornos lipídicos genéticos con elevaciones extremas del LDL-c, conducen a la necesidad de la búsqueda de nuevas estrategias para la prevención del proceso de aterosclerosis.

El hallazgo de la pro-proteína convertasa subtilisina kexina tipo 9 (PCSK9) hace no más de 13 años en pacientes con hipercolesterolemia familiar (HF), debida a una mutación de PCSK9 con ganancia de función, resultó ser el punto de partida para el desarrollo posterior de una estrategia farmacológica a fin de regular e inhibir esta proteína con el objetivo fundamental de disminuir los niveles circulantes de LDL-c (Corral et al, 2016).

Por otro lado, se estudió si era posible que las mutaciones con pérdida de función estuvieran ligadas a niveles bajos de LDLc y por tanto menor riesgo cardiovascular.

Desde el punto de vista farmacológico, la inhibición de la PCSK9 a nivel hepático permite, fundamentalmente, evitar la degradación del receptor de LDL (LDLr) y de esta forma aumentar los niveles de éste sobre la membrana del hepatocito, para más tarde poder captar más moléculas de LDL circulantes. Por lo tanto, a menor nivel de PCSK9, más número de LDLr y menos nivel de LDL-c circulante.

En esta revisión se describe el descubrimiento, funciones y mutaciones de esta proproteína y se profundiza sobre los aspectos farmacológicos de la inhibición de la PCSK9.

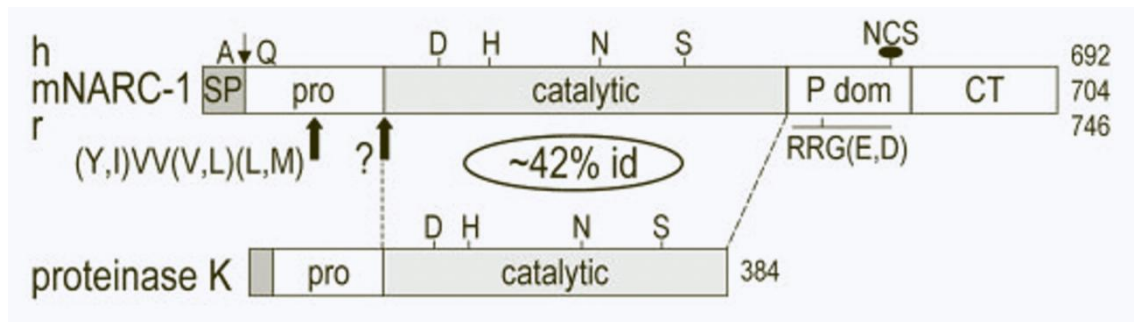
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

4.1. ANTECEDENTES:

En **2003**, científicos de Millennium Pharmaceuticals descubrieron la Proproteína Convertasa Subtilisina/Kexina del tipo 9, (PCSK9) en un estudio sobre la proteína convertasa NARC-1 (Neural Apoptosis-Regulated Convertase 1). Este estudio reveló que la NARC-1, tiene actividad, tras su escisión en el retículo endoplasmático, una característica semejante a la familia de las PKs, (Proteinase K-like) y SKI-1 (Src Kinase Inhibitor I), por tanto, se entendió que tenía que ser una proproteína similar que todavía no estaba identificada (Seidah et al., 2003) (Fig.1).

Otro atractivo de esta proteína NARC-1 es su abundancia en el hígado, por lo que desde el punto de vista patológico resultó interesante seguir investigándola.

Fig.1: Esquema de narc-1 y su comparación con la familia proteinasa k



La subunidad catalítica de ambas es idéntica aproximadamente en un 42% (Seidah et al., 2003)

En junio de ese mismo año, se publicó un ensayo sobre la Hipercolesterolemia Autosomal Dominante (ADH) como factor de riesgo coronario (Abifadel et al., 2003). Esta ADH se caracteriza por un incremento en las lipoproteínas de baja densidad circulantes en el organismo (LDL-c).

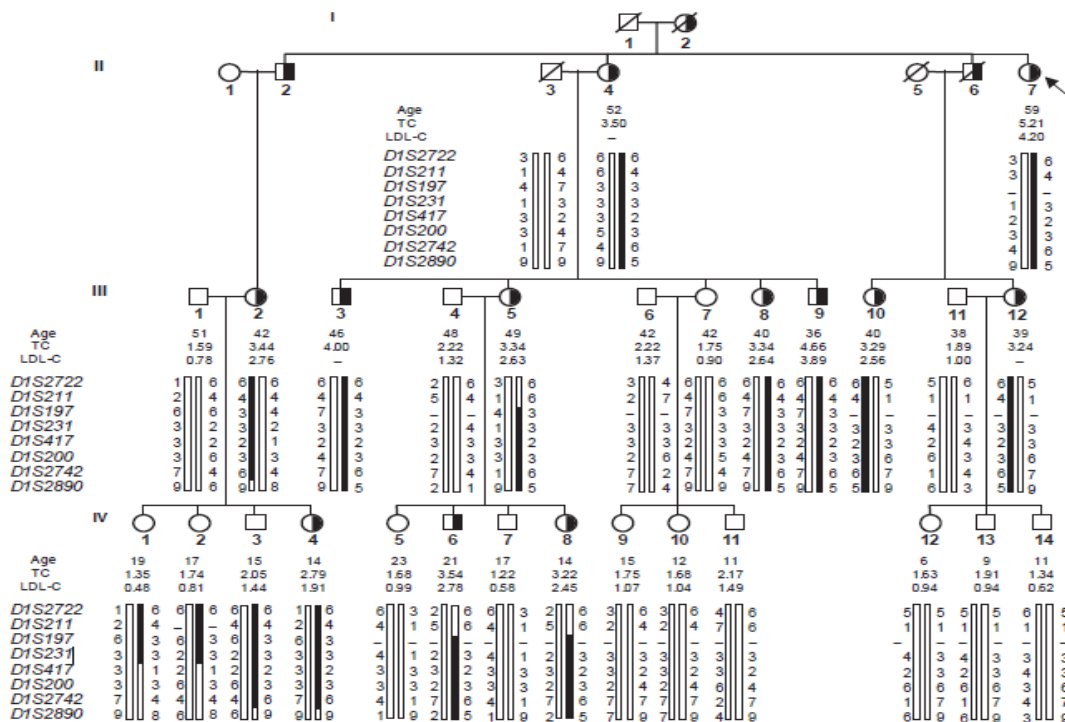
Hasta ese momento la ADH se asociaba a dos mutaciones, la primera, una mutación que afecta a los genes de los receptores de LDL y la segunda a una mutación en la ApoB, la

apolipoproteína B es una proteína primaria de las partículas: quilomicrones, VLDL, IDL y LDL, que es la responsable del transporte de las moléculas de lípidos, incluido el colesterol, alrededor del cuerpo a todas las células dentro de todos los tejidos. Este grupo de investigación quería descubrir la existencia de otra posible mutación que estuviera relacionada con la ADH.

Para identificar esta nueva mutación asociada a la ADH, se recurrió a un ensayo con 23 familias francesas con hiperlipidemia familiar, en las cuales los dos lugares ya conocidos de mutaciones (mutación LDLR y mutación ApoB) estaban excluidos.

De estas 23 familias, dos en particular a las que se llamó HC29 y HC2, mostraron una mutación de Timina por Adenina en el exón 2 de los 12 de la PCSK9. Esta mutación de PCSK9 se comparó con otros 100 sujetos para descartar el polimorfismo. Esta mutación de T por A desencadena la sustitución de Serina por una Arginina en el codón 127(Fig.2).

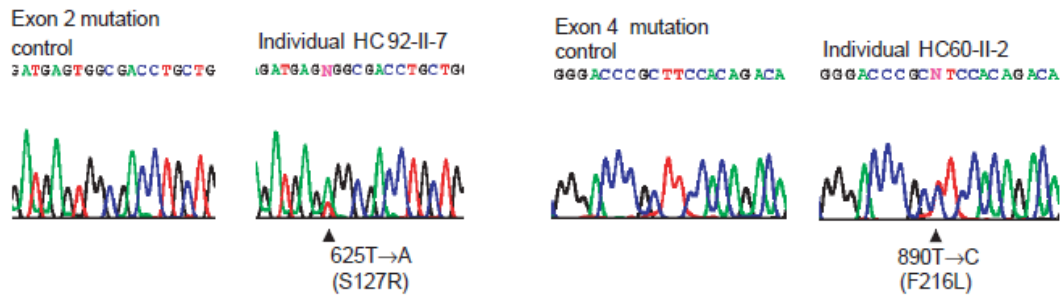
Fig.2: Pedigrí de la familia HC92



Pedigrí de la familia HC92 y análisis genético con marcadores que abarcan la región 1p34.1-1-p32. Los individuos afectados presentes tienen un historial de xantomas tendinosos (individuos HC92-II-7 y HC92-III-3), enfermedad coronaria, infarto de miocardio temprano (individuos HC92-II-2 y HC92-II-6) y apoplejía (individuo HC92-II-4). Las barras rellenas indican el alelo mutado (Abifadel et al., 2003).

Tras esta mutación de las familias HC29 y HC2, se descubrió una segunda mutación en otra familia HC60, donde en el exón 4, una Timina se sustituye por una Citosina, esta mutación se vio que afectaba al 12,5% de las familias investigadas.

Fig.3: Representación de las distintas mutaciones en sus exones correspondientes



(Abifadel et al., 2003)

Este estudio concluyó con la denominación de las nuevas mutaciones descubiertas, se llamó **S127R** a la mutación en el exón 2 de una Timina por una Arginina, y **F216L** a la mutación del exón 4 con el cambio de una Timina por una Citosina (Fig.3)

En **2004**, los estudios en este ámbito dan un espectacular resultado, se descubre que NARC1/PCSK9 se obtiene a través de pro-Narc1/proPCSK9. PCSK9 al igual que el precursor del receptor de LDL se sintetiza en el retículo endoplasmático con una conversión que es Ca^{2+} independiente, y la unión de los dos facilita el movimiento del receptor desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi, donde pro-PCSK9 adquiere residuos de carbohidratos y se produce su escisión autocatalítica, para pasar a ser una proteína activa, PCSK9 (Benjannet et al., 2004).

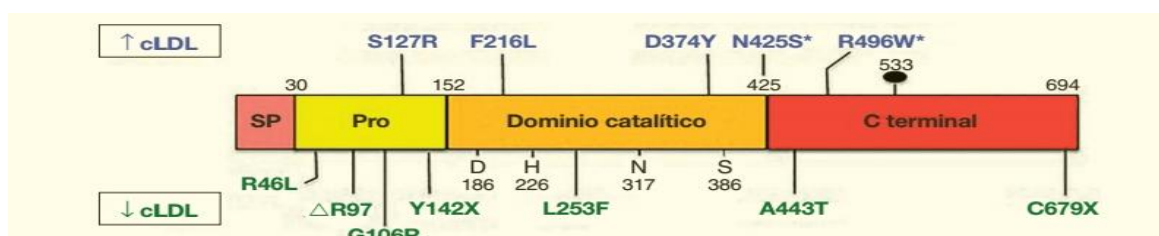
Además se descubrió, que en el aparato de Golgi, la región prodominio de la proproteína se escinde autocatalíticamente, pero permanece unida a la PCSK9 de forma no covalente para facilitar el plegamiento de la ésta y el bloqueo de su actividad catalítica.

Por otro lado, se demostró que las mutaciones de PCSK9 llamadas **S127R** Y **D374Y** dan como resultado un aumento del proceso del zimógeno, y por tanto un aumento en la actividad de la proproteína. Mientras que la doble mutación de PCSK9 (**D374Y +N157K**), la mutación **F216L** y la mutación **R218S** dan como resultado una normal producción y escisión del zimógeno (Seidah et al., 2003) (Fig.4).

Posteriormente se planteó un estudio para determinar cómo afectan las mutaciones de PCSK9 dentro de toda la ruta del metabolismo del colesterol. Se inyectó a ratones macho Adenovirus, con PCSK9 “salvaje” (no mutado) y con las mutaciones **S127R** o **F216L** (S.Wook Park et al, 2004).

Las inyecciones a ratones con PCSK9-Adenovirus dieron como resultado un incremento de colesterol total debido a un incremento específico de los niveles de LDL circulante. Además, los ratones inyectados con PCSK9 salvaje (no mutado) mostraron una ausencia significativa de receptores LDL (LDLr) en hígado pero niveles normales de ADN mensajero, ADN-m, de LDL, el encargado de transcribirse para dar nuevos receptores (Maxwell & Breslow, 2004).

Fig.4: Representación de las mutaciones de PCSK9



Representación de las mutaciones de PCSK9 y su consecuencia en el aumento o disminución de los niveles de PCSK9 (Pedro-Botet & Badimón, 2016).

4.2. FUNCIÓN Y REGULACIÓN GÉNICA DE PCSK9

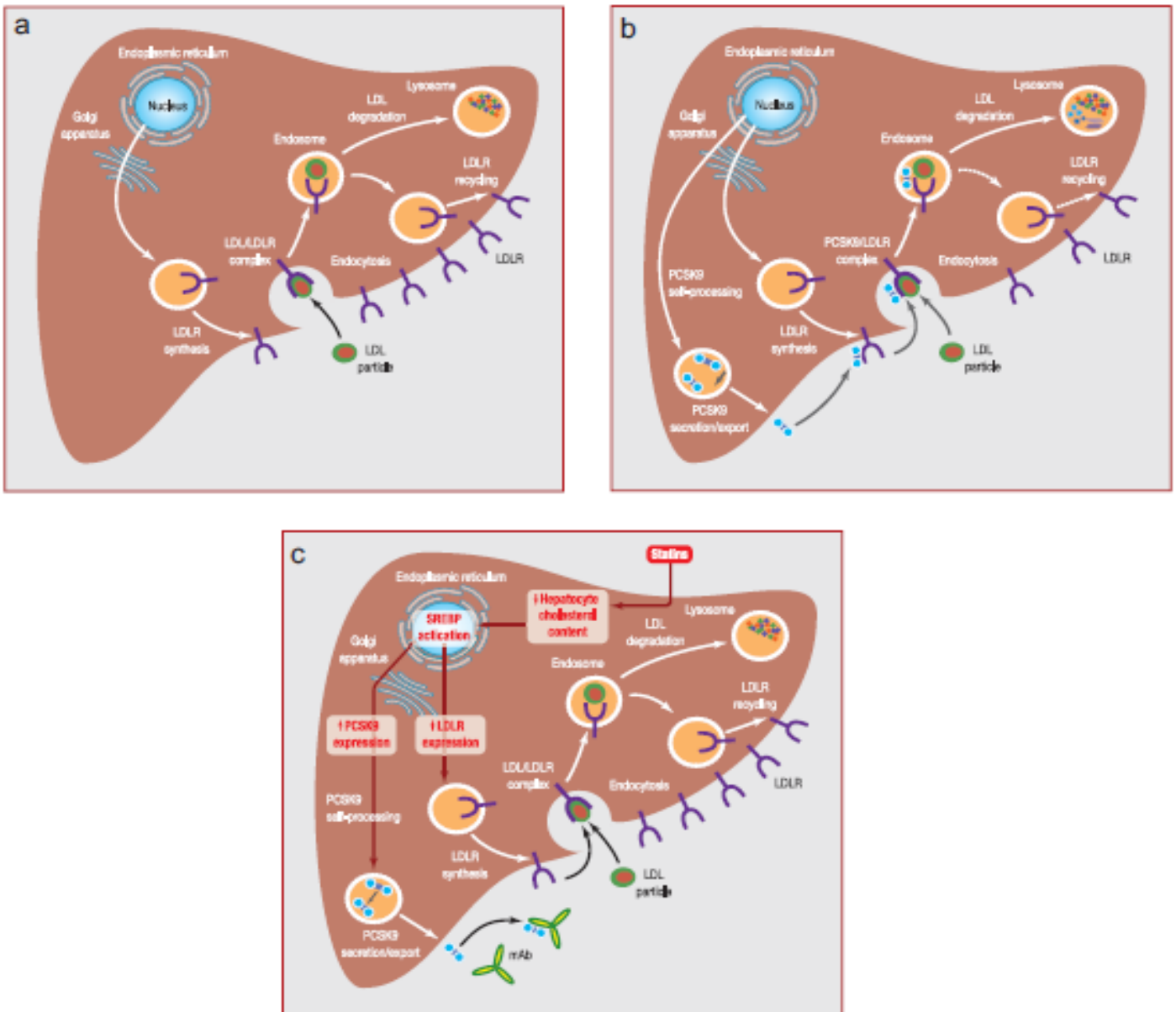
La PCSK9 es una proteína de 692 aminoácidos con un peso molecular de 72kDa, que consta de una región prodominio rico en histidina y cisteína C-terminal, que se expresa sobre todo en hígado y también en intestino, riñones y sistema nervioso central.

En **2004**, se describió la función principal de PCSK9 es la maduración proteolítica de las proteínas secretadas por el cuerpo, como hormonas, citocinas, factores de crecimiento y receptores de la superficie celular (Pedro-Botet & Badimón, 2016). Aunque la función principal de PCSK9 sea la maduración proteolítica, la mejor característica de esta proteína hace referencia a su unión con los receptores de LDL (LDLr) en los hepatocitos.

La principal vía de eliminación de LDLc es a nivel hepático por endocitosis de los LDLr. Dado que la vida media de un LDLr es de unas 20 h y que en el reciclado se emplean de 10 a 15 min, el LDLr es capaz de recircular de nuevo a la superficie celular hasta 150 veces, desempeñando la PCSK9 un papel fundamental en el metabolismo del LDLr.

El mecanismo de la degradación del LDLr requiere de la actividad catalítica de PCSK9, mediante la unión al LDLr, la PCSK9 interrumpe el reciclado del LDLr y lo conduce a su degradación, hecho que comporta una disminución del número de LDLr disponibles (Fig.5).

Fig.5: Función de PCSK9 en la regulación de la actividad de LDLr en el hepatocito:



FUNCIÓN DE PCSK9 EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LDLR EN EL HEPATOCITO:

A) Síntesis y reciclado de LDL-R B) Síntesis secreción de PCSK9 y efecto en los LDL-R (PCSK9 se une a LDL-R y, ocurre la internalización, LDL-R llega a la degradación lisosomal, disminuye el número de LDL-R en la superficie de la célula) C) Mecanismo de acción de las estatinas contra PCSK9 (La terapia con estatinas activa la vía SREBP-2, la cual estimula la expresión de PCSK9 y LDLR).

4.2.1. Regulación de la expresión génica de PCSK9

Varios factores de transcripción regulan la expresión génica de PCSK9, incluyendo las proteínas de unión al elemento regulador de los esteroides (SREBP-1/2) (Pedro-Botet & Badimón, 2016).

La expresión de SREBP1, proteína de unión al elemento regulador de esterol 1, en los hepatocitos se incrementa por la insulina y, en consecuencia, hay un aumento de la expresión de PCSK9. Sin embargo, la insulina también puede activar la diana complejo rapamicina /proteincinasa, donde se consigue una menor expresión de PCSK9 en los hepatocitos.

Además, la hiperinsulinemia disminuye la expresión de PCSK9, un efecto que se ha observado en mujeres obesas menopáusicas. Por el contrario, en varones sanos la hiperinsulinemia mantenida durante 24 h no alteró las concentraciones de PCSK9 y la expresión de PCSK9 fue similar en pacientes sanos, prediabéticos y diabéticos. Por lo tanto, el efecto global de la insulina sobre la expresión de PCSK9 parece ser neutro (Horton et al, 2007).

Cuando el colesterol intracelular disminuye, se inicia una secuencia que incluye la activación y translocación del factor de transcripción SREBP2 (proteína de unión al elemento regulador de esteroides 2). Esta proteína activa al gen SREB, lo que resulta en la síntesis de mayor cantidad de LDLr y HMGCoA reductasa, la enzima limitante de la biosíntesis endógena del colesterol; sin embargo, simultáneamente, se activa también la síntesis de PCSK9, lo que parece tener un efecto contrarregulador (Pedro-Botet & Badimón, 2016).

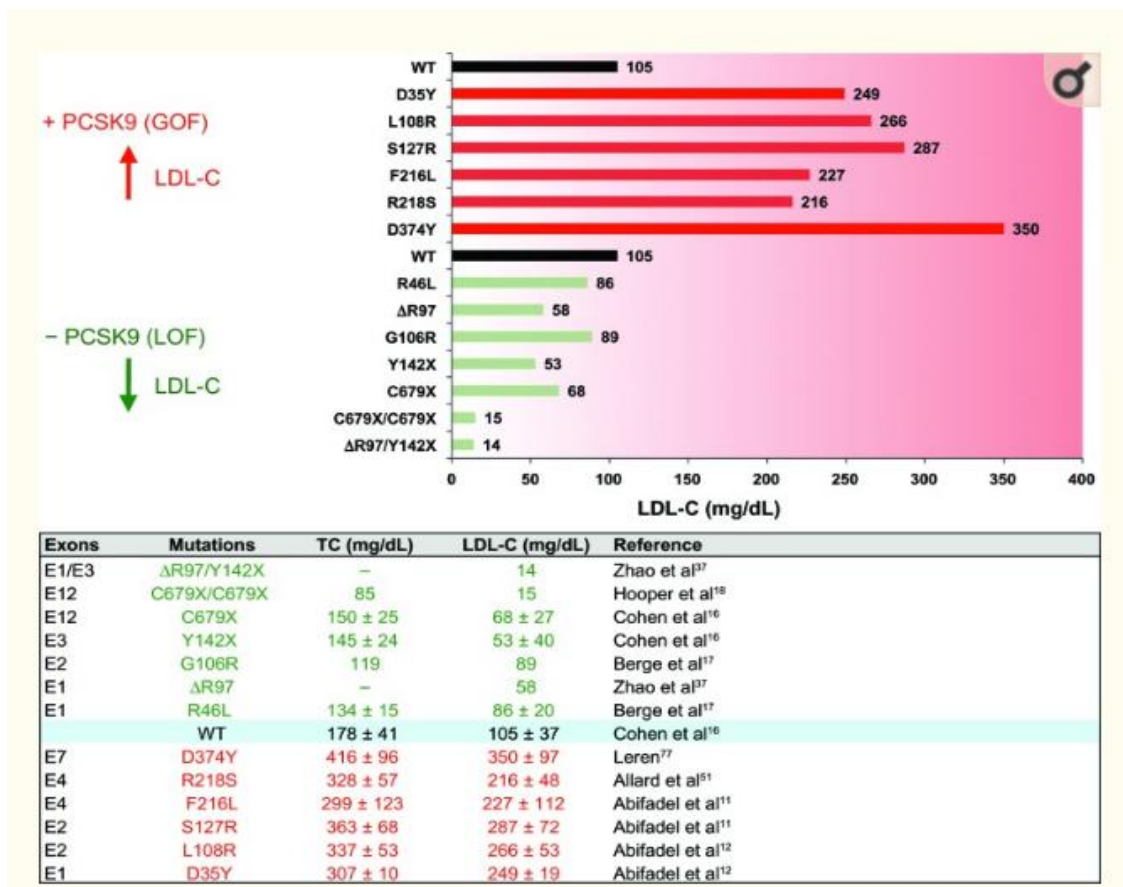
4.3. MUTACIONES PCSK9

4.3.1. Mutaciones con ganancia de función

Las mutaciones con ganancia de función se definen como aquellas mutaciones que dan como resultado una nueva capacidad funcional de una proteína, detectable a nivel fenotípico. Las mutaciones de ganancia de función normalmente son dominantes, porque sólo se necesita una única copia del nuevo gen para producir la nueva función.

Por tanto, los descubrimientos iniciales de las mutaciones en PCSK9 con ganancia de función como causa de hipercolesterolemia familiar, fueron seguidos por la descripción de mutaciones en PCSK9 con pérdida de función acompañadas de una reducción del colesterol (Fig.6).

Fig.6: Mutaciones con ganancia y pérdida de función



Las barras rojas representan las mutaciones con AUMENTO DE FUNCIÓN, mientras que las verdes representan las mutaciones de PÉRDIDA DE FUNCIÓN. Las mutaciones implicadas se encuentran a la izquierda del eje y en la fórmula “aminoácido original” posición “aminoácido mutado” (Poirier & Mayer, 2013).

4.3.2. Mutaciones con pérdida de función

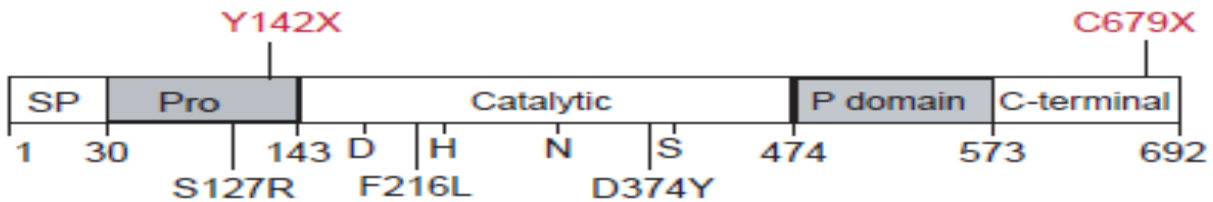
Las mutaciones sin sentido (pérdida de función) de PCSK9 son relativamente comunes, sobretodo en descendientes de africanos (en el estudio correspondiente llamados BLACKS) (J. Cohen et al., 2005).

Para probar si esta pérdida de función de PCSK9 tiene el efecto opuesto a la ganancia de función y ayuda a la hipocolesterolemia, se desarrolló un estudio científico donde secuenciaron la región codificante de PCSK9 de 128 personas de las cuales el 50% eran afroamericanos (BLACKS), y todos tenían en común niveles bajos en plasma de LDL.

En este estudio se descubrieron 2 mutaciones sin sentido **Y142X** y **C679X**. Estas mutaciones son bastante comunes en afroamericanos (BLACKS), pero no muy comunes en euroamericanos

(0,1%) y lo más importante de éstas es su asociación a una reducción de los niveles de LDL en plasma de entorno a un 40% (Fig.7).

Fig.7: Mutaciones Y142X y C679X



(J. Cohen et al., 2005)

En las secuencias de ADN identificadas con las 2 mutaciones sin sentido. Se encontró una sustitución 426C→G en el exón 3 de PCSK9 en 3 de los 64 individuos afroamericanos (BLACKS). Esta mutación sustituye una tirosina por un codón terminal en el residuo 142 (**Y142X**), el cual predice la eliminación de cuatro quintos de la proproteína (J. Cohen et al., 2005) (Fig.7).

Además se encontró una segunda mutación 2037C→A en 4 individuos afroamericanos, esta mutación sustituye una cisteína por una señal de terminación prematura en el codón 679 (**C679X**) y cambia la proproteína en 14 aminoácidos. Ambas mutaciones se reflejaron en un 11% (7 de 64) de los afroamericanos (BLACKS) con bajos niveles de LDL-c en plasma. (J. Cohen et al., 2005) (Fig.7).

Para determinar cómo de comunes son estas mutaciones se analizó una población independiente de 850 personas afroamericanas en Cook Country, Illinois.

Este estudio dio como resultado una frecuencia del 0,6% en la mutación **Y142X** y una frecuencia de 1,6% en la mutación **C679X**, parecida a la obtenida en el estudio anterior. Se determinó entonces, si estas mutaciones de alelos de individuos aparentemente no relacionados pertenecía a un antecesor común, a lo que se llegó a la conclusión tras el estudio de que ninguna de las dos mutaciones lo era, pero sí que se puede afirmar que ambas mutaciones son antiguas y han prevalecido a lo largo de los años.

Por otro lado en este estudio se observó también que los individuos con las mutaciones tenían niveles de colesterol total y LDL-c más bajos de lo normal, pero no todos.

Para determinar si están relacionadas las mutaciones con la hipocolesterolemia familiar se estudiaron a dos familias de dos personas con **Y142X** y otras dos de personas con **C679X**, se concluyó que los individuos de esas familias con la mutación tenían niveles más bajos de LDL, que la población normal.

Posteriormente, se estudiaron 63 familias más (57 euroamericanas y 6 afroamericanas). Ninguna de las euroamericanas tenía mutación en PCSK9 y en una de las afroamericanas sí se encontró la mutación **Y142X**, en esta familia todos los individuos con la mutación tenían niveles bajos de LDL-c en plasma.

Esto respaldó aún más que las mutaciones sin sentido no son frecuentes en euroamericanos pero sí en afroamericanos, y son causa directa de niveles bajos de LDL en plasma. Estos datos concuerdan con los del trabajo de Maxwell y Breslow en 2004 (Maxwell & Breslow, 2004), indican que las mutaciones de PCSK9, **Y142X** y **C679X** son mutaciones con pérdida de función. En los ratones era una sobreexpresión de PCSK9 la que causaba una reducción del número de receptores de LDL.

Las mutaciones sin sentido en PCSK9 probablemente reducen los niveles de LDL-c plasmático incrementando el número de receptores de LDL. Este descubrimiento implica que PCSK9 actúa de manera normal reduciendo el número de LDLr (Peterson et al, 2008).

Las dos mutaciones sin sentido que fueron identificadas en PCSK9, son las dos variantes más comunes descritas, y tienen un efecto significativo en los niveles de colesterol en plasma. La alta frecuencia de estas dos mutaciones antiguas y su aparición en el mismo gen de personas con ascendencia africana sugiere la selección positiva que ha mantenido este alelo en la población (Kathiresan, 2008).

También se demostró la existencia de una mutación llamada **R46L**, donde se produce un cambio 137G→T lo que se traduce en la sustitución de Arginina por Leucina en el gen 46. Además se demostró la prevalencia de esta mutación es mayor en personas de ascendencia caucásicas, y menor en aquellas de ascendencia africana. Esta mutación está asociada a una reducción de entorno a un 21% de los niveles de LDL en plasma (J. C. Cohen et al, 2006).

Tabla 1: Características generales de las mutaciones de PCSK9

MUTACIONES PCSK9	
MUTACIONES GANANCIA DE FUNCIÓN	MUTACIONES PÉRDIDA DE FUNCIÓN
Función de PCSK9 ↑	Función de PCSK9 ↓
Degradación de los LDLr-r↑	Degradación de los LDLr-r ↓
nº de LDLr ↓	nº de LDLr ↑
Absorción de LDLc ↓	Absorción de LDLc ↑
Concentración LDLc ↑	Concentración LDLc ↓

4.4. ESTRUCTURA CRISTALINA DE PCSK9

En **2007** y **2008**, se comenzó a investigar la estructura cristalina de la PCSK9.

Novartis, en su estudio “The self-inhibited structure of full-length PCSK9 at 1,9 Å reveals structural homology with resistin within the C-terminal domain”, presentó una reconstrucción de PCSK9. En ella se sugiere que la estructura tiene un dominio C-terminal rico en cisteína totalmente plegado llamado CRD que muestra un distintivo estructural parecido a una pequeña citoquina asociado con la obesidad y la diabetes. (Hampton et al., 2007)

Al mismo tiempo los laboratorios Amgen realizaron su propio estudio de la estructura cristalina, donde se utilizó PCSK9 de longitud completa para su cristalización, se nombró Dominio V a lo que Novartis llamó CRD. El prodominio se extiende desde los residuos 61 a 152, y se vio que la autocatálisis rompe el enlace peptídico entre Gln152 y Ser153. Además, el dominio catalítico se extiende desde los residuos 153 a 447 y tiene dos bucles que carecen de densidad de electrónica. El dominio V se extiende desde los residuos 452 a 683 (Piper et al., 2007).

- **La estructura del prodominio**

Para realizar su función la PCSK9 tiene que escindirse de zimógeno a proteína activa con una autocatálisis, la peculiaridad es que el prodominio al escindirse la molécula se sigue quedando asociado y cercano al sitio activo de la proproteína, haciendo la función de chaperona y ayudando al correcto plegamiento. Con la estructura cristalina se observó que podía ser para inhibir una actividad mayor de la normal (Fig.8).

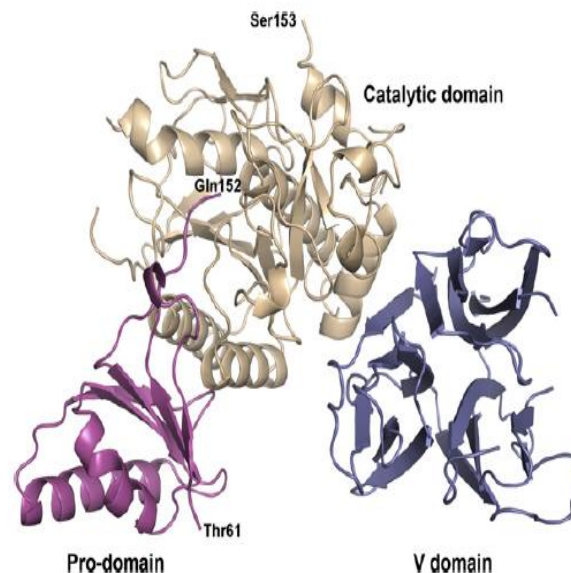
- **El dominio catalítico**

El núcleo de la estructura, y dominio catalítico se ajusta a lo normal en una proteasa de tipo subtilisina, un dominio de Serina con una α/β proteína formada por un sándwich de siete hileras paralelas de hebras β entremezcladas con un conjunto de hélices, inhibido por su prodominio (Fig.8).

- **El dominio V/ CRD**

El dominio V de PCSK9 es una novedad, se trata de un dominio con un gran número de residuos de histidina situado junto al dominio catalítico formando una hoja de trébol de subdominios (Fig.8).

Fig.8: Estructura tridimensional de la proteína PCSK9



(Lambert et al, 2009)

A pesar de la unión relativamente débil entre los dominios y la presencia de un enlazador flexible entre ellos, parece probable que esta es la conformación fisiológica de la molécula.

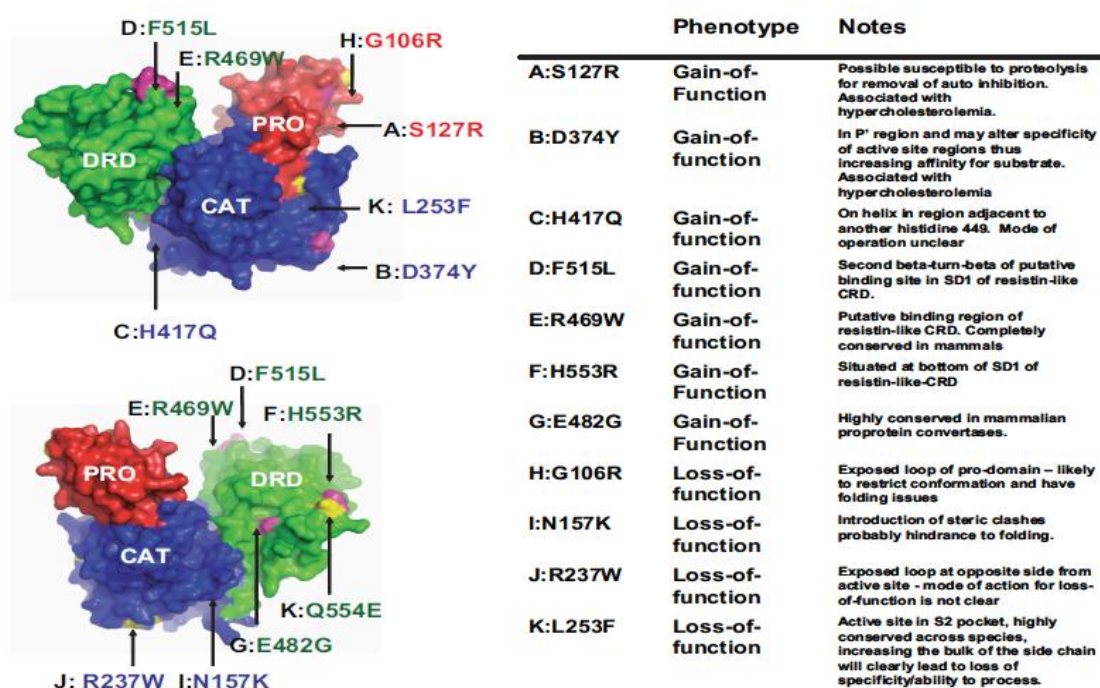
4.4.1. Estructura cristalina y mutaciones:

En apartados anteriores se han descrito diversas mutaciones, como resultado del estudio genético de las variantes naturales de PCSK9. Se puede decir que las mutaciones asociadas a la pérdida de función están caracterizadas por ser mutaciones sin sentido o mutaciones relacionadas con anomalías en el proceso de plegamiento o el sitio activo de la PCSK9.

Un ejemplo es la mutación sin sentido **C679X** que ocurre en el penúltimo enlace de disulfuro, lo que sugiere una interrupción en el patrón de plegamiento de CRD y, por lo tanto, el procesamiento incorrecto o el plegamiento de la molécula.

En otra mutación de pérdida de función, **R46L**, los datos nos han reportado que esta mutación se encuentra dentro del prodominio N-terminal, (aminoácidos 31-60). La flexibilidad que tiene esta zona, hace que no esté claro si la pérdida de la función es el resultado de un problema de plegamiento o de un problema de secreción de la proproteína desde el retículo endoplasmático. Es posible que la estructura se reordene en respuesta a un factor vinculante o un factor fisicoquímico ambiental desconocido. En tales circunstancias, la pérdida de la función debida a la mutación podría influir en esta unión u orden secuencial (Fig.9).

Fig.9: Mutaciones de PCSK9 en su estructura tridimensional



Mapeo de las mutaciones más comunes de PCSK9 en la superficie de la molécula. PCSK9 se muestra en dos orientaciones relacionadas entre sí mediante una rotación de 180° alrededor del eje y. Las mutaciones con ganancia de función están en color Magenta y las mutaciones con pérdida de función en amarillo (Hampton et al., 2007).

Las mutaciones de ganancia de función son más diversas en su acción según el fenotipo, en general podemos afirmar que las mutaciones aumentan la afinidad de unión, entre la PCSK9 y su sustrato, proporcionando así una molécula más activa (Hampton et al., 2007).

Las mutaciones de ganancia de función se distribuyen alrededor de la superficie de la proproteína, en el caso de la mutación **D374Y** cumple la generalidad de influir en la afinidad de unión por el sustrato.

Otro caso es la mutación en el prodominio llamada **S127R**, esta puede aumentar la unión o mejorar la susceptibilidad del dominio a la escisión por proteasas

Un tercer estudio, basado en el hecho de que la unión de esta proproteína a los LDLR en la superficie de la célula es lo que conduce a su degradación, utilizó la estructura cristalina de la PCSK9 para determinar cómo se une esta los receptores de LDL (Kwon et al, 2008).

El sitio de unión de PCSK9 a LDLr, se localizó en el factor de crecimiento epidérmico (EGF-A) del LDLR, y además se describió la estructura cristalina del complejo entre PCSK9 y el dominio EGF-A del LDLR.

El sitio de unión de PCSK9 para el dominio EGF-A del LDLr, se encuentra en la superficie del dominio catalítico de tipo subtilisina de PCSK9, que contiene una Asp-374. Un residuo para el cual una mutación de ganancia de función (Asp-374-Tyr) aumenta la afinidad de PCSK9 hacia LDLR y aumenta los niveles de LDL-c en plasma, debido a la mayor eliminación de receptores.

El sitio de unión en PCSK9 está a una cierta distancia de su dominio catalítico, por tanto el dominio EGF-A no tiene ningún contacto ni con el dominio C-terminal ni con el prodominio de PCSK9. Mutaciones puntuales en PCSK9 que alteraron residuos clave que contribuyen al EGF-A (Arg-194 y Phe-379) disminuyen en gran medida la unión con el dominio extracelular de LDLR.

La PCSK9 se une directamente al LDLR en la superficie del hepatocito y la degradación estimulada por PCSK9 del LDLR requiere una proteína adaptadora necesaria para la internalización de LDLR. La afinidad de la unión de PCSK9 al LDLR se mejora a pH ácido, lo que sugiere que PCSK9 se une más ávidamente a los LDLR en el compartimentos lisosomiales/endosómicos.

Una mutación con ganancia de función, Asp-374-Tyr, es 10 veces más activa que una PCSK9 “salvaje” en la degradación de LDLR, debido a una afinidad aumentada de 5 a 30 veces de PCSK9 por el LDLR.

4.5. PRUEBA DE LA INHIBICIÓN DE PCSK9 EN ANIMALES

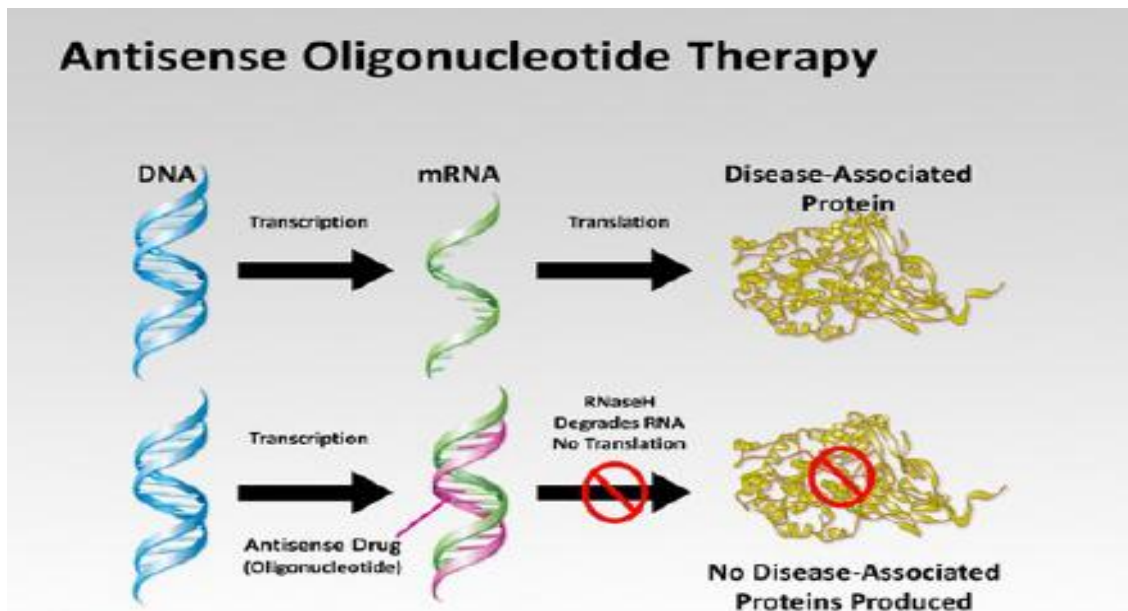
4.5.1. Prueba en ratones

Una vez estudiada la PCSK9 como diana farmacológica, durante **2007, 2008 y 2009** se procedió a las primeras pruebas de los posibles fármacos en animales.

En 2007, se realizaron las primeras pruebas de un inhibidor de PCSK9 en ratones. Para este estudio se utilizó como posible fármaco ASO (Anti Sense Oligonucleótidos) (Graham et al., 2007).

Los ASO, Anti Sense Oligonucleótidos, son una serie de oligonucleótidos de fosforotioatos quiméricos de 20 monómeros que contienen grupos 2'-O-metoxietilo en las posiciones 1-3 y 17-20 dirigidos a PCSK9 de ratón. El más potente ASO, ISIS 394814 (5'-GGGCTCATAGCACATTATCC-3'), fue el elegido para todas las evaluaciones farmacológicas posteriores in vivo (Fig.10).

Fig.10: Terapia con Oligonucleótidos Antisentido



(Goldberg, 2010)

ISIS 141923 (5'-CCTTCCTGAAGGTTCTCC-3'), otro oligonucleótido, no complementario a ninguna secuencia de genes conocida, fue utilizado como control en el estudio de ASO.

Para determinar si la supresión de PCSK9 tendría como resultado un incremento de los niveles de LDLr, se midieron los niveles de LDLr de ratones con dieta alta en lípidos antes y después de 6 semanas de tratamiento con ASO.

Se demostró así, que la administración de ASO PCSK9 de segunda generación a ratones hiperlipidémicos reduce la expresión de ARNm de PCSK9 hepático hasta en un 92% y da como resultado una significativa reducción del colesterol total y en particular de LDL.

Como otros inhibidores de segunda generación anti sentido, ASO PCSK9, ISIS 394814 es perfectamente tolerada en ratones. Además se demostró como una supresión farmacológica directa de la PCSK9 puede reducir los niveles de LDL. Se puede constatar como la PCSK9 tiene un papel importante en la regulación de la homeostasis del colesterol, como ya se propuso en los primeros estudios de ratones con ausencia de la PCSK9.

Sorprendentemente, los únicos efectos significativos de la inhibición de PCSK9 fueron un aumento en la expresión del ARNm de ApoBec1, enzima responsable de la producción de apoB-48, que contiene lipoproteínas dentro del intestino delgado de mamíferos, (de 2 a 3 veces) con una inducción concordante en suero de niveles de proteína apoB-48 (3 veces). Esta se expresa en roedores, pero no en hígado humano.

Se concluyó, que PCSK9 es una proteasa con algunas funciones aún desconocidas. Parece plausible que, además de actuar sobre LDLR, pudiera actuar sobre otros sustratos adicionales, como podrían ser las proteínas involucradas en la edición de ARNm de ApoB. Claramente, son necesarios más estudios para afirmar esta hipótesis.

Un inhibidor específico y selectivo de PCSK9 podría hacer posible la determinación de su mecanismo de acción. Se planearon estudios adicionales para determinar si alteraciones en la expresión de ARNm de ApoBec1 en el hígado y el intestino de los animales tratados se correlacionan con algún tipo de consecuencia fisiológica adversa.

Según este estudio, se demostró que la inhibición específica de PCSK9 a través de fármacos tradicionales era difícil. Por ello, los ASO de segunda generación podrían ser una opción. Siendo estos unos fármacos estables y altamente solubles, que pueden administrarse bien en forma de solución salina por inyección subcutánea u otras vías de administración. La farmacocinética de estos medicamentos se caracterizó bien. Después de administrar la dosis subcutánea, más del 12% de la dosis se distribuye al hígado, el principal sitio de expresión de

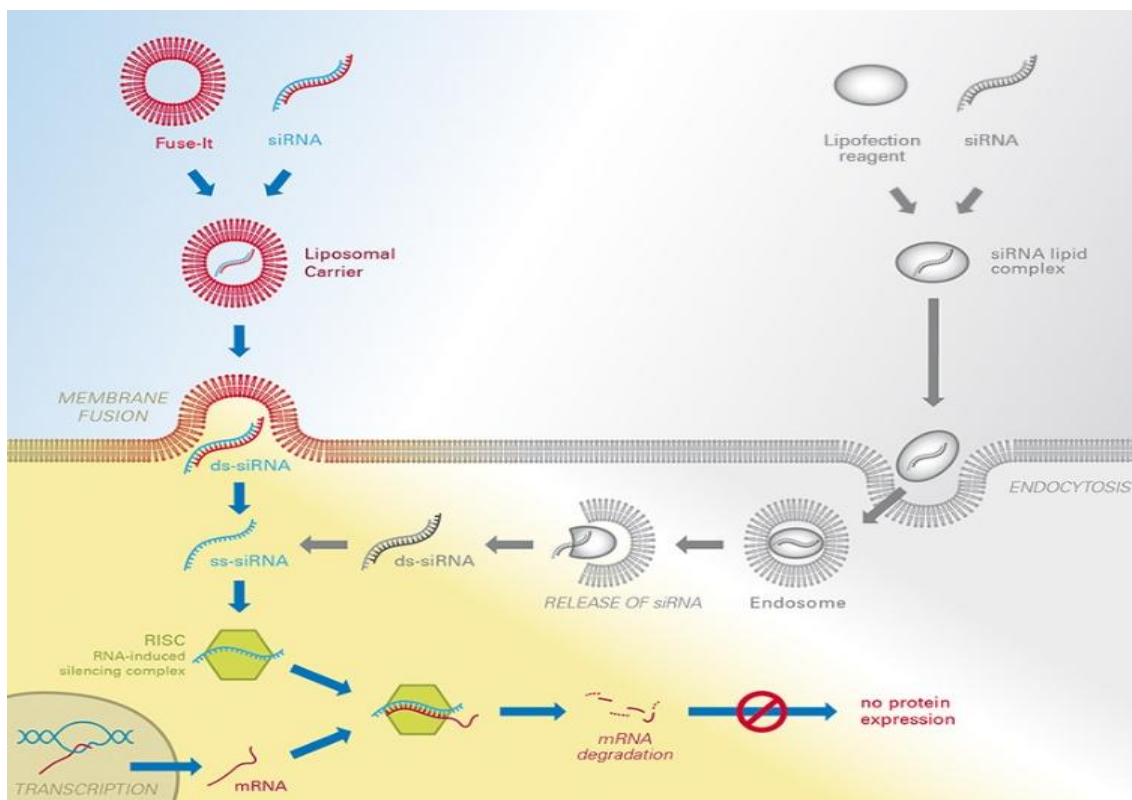
PCSK9. Debido a su larga vida media de eliminación y a un perfil de seguridad bien caracterizado, estos medicamentos pueden administrarse semanalmente.

En base a estos convincentes resultados iniciales, se realizaron además estudios para evaluar aún más el potencial de PCSK9 como una intervención dirigida para reducir el colesterol en animales que tienen perfiles de lípidos séricos más similares a humanos, como primates no humanos.

4.5.2. Prueba en primates no humanos

Para primates no humanos (NHP), en cambio, el fármaco utilizado fue SiRNA, pequeños fragmentos activos de ARN de interferencia, capaces de ir dirigidos a la PCSK9. Para estudios in vivo, se formularon PCSK9 y siRNAs de control en una nanopartícula lipidoide (LNP) (Frank-Kamenetsky et al., 2008) (Fig.11).

Fig.11: Mecanismo de acción SiRNA



<https://ibidi.com/membrane-fusion-transfection/198-fuse-it-sirna.html>

La reducción en la transcripción PCSK9 se asoció con una reducción de hasta un 60% en las concentraciones de colesterol en plasma. En NHP, una única dosis de SiARN dirigida hacia la PCSK9 dio como resultado una disminución rápida, duradera y reversible de PCSK9 en plasma,

ApoB y LDLc, sin efectos medibles en el colesterol HDL (HDLc) y triglicéridos (TG). Los efectos del silenciamiento de PCSK9 duraron 3 semanas después de una administración de un solo bolo intravenoso. Estos resultados validaron la orientación del tratamiento terapéutico con SiRNA frente a PCSK9 como un enfoque para reducir específicamente LDLc.

Se demostró que los efectos de la inhibición de PCSK9 son altamente positivos en modelos animales como hemos visto anteriormente en ratones con inhibidores de PCSK9 y ratones knock-out.

Además, el inicio agudo de la disminución del LDLc obtenido con siRNAs de PCSK9 podría ser beneficioso en un subconjunto de pacientes que sufren un infarto agudo de miocardio donde la disminución de inicio rápido de LDLc puede ser muy beneficiosa.

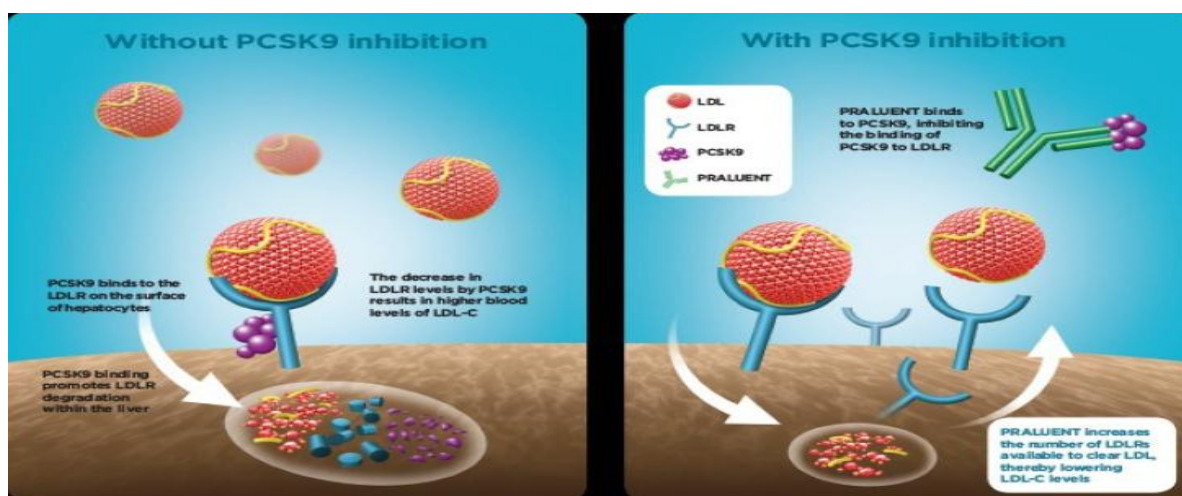
Los resultados presentados aquí, validan la disminución de PCSK9 por SiRNA como un enfoque terapéutico con alto potencial para reducir de forma aguda el LDLc y allanar el camino para el desarrollo de novedosos agentes reductores de PCSK9 para su uso en el tratamiento de hipercolesterolemia. Más tarde, se inició la Fase 1 de prueba del futuro fármaco en personas sanas y tuvo resultados realmente malos en cuanto a seguridad y reacciones adversas, por lo que se desechó el fármaco pero no la diana.

4.6. PRIMERA PRUEBA DEL FARMACO EN HUMANOS

Tras los estudios en animales en **2012** se procedió a la primera prueba de fármaco, inhibidor de PCSK9 en humanos, el fármaco en cuestión se llamó REG727/SAR236553 (REG727). Se trata de un anticuerpo monoclonal completamente humano que es altamente específico para PCSK9 humana y bloquea su interacción con el receptor de LDL (Stain et al., 2012) (Fig.12).

Para los ensayos clínicos de Fase 1 del fármaco, se realizaron 3 estudios clínicos diferentes. Dos de ellos eran de dosis única de REGN727, administrada o bien de manera subcutánea o intravenosa a pacientes sanos y la tercera un estudio multidosis de administración subcutánea en pacientes con hipercolesterolemia familiar o no familiar.

Fig.12: Mecanismo de acción REGN727



<https://www.praluent.com/pcsk9-inhibitor>

4.6.1. Dosis única

Para los estudios de dosis única, participaron 40 individuos a los que se les administró REGN727 vía intravenosa y otro grupo de 32 individuos que recibieron REGN727 vía subcutánea. Todos los participantes tenían unos niveles de LDL-c en plasma de más de 100mg por dL (2,59mmol por Litro) y el uso de cualquier agente que alterara los niveles lipídicos fuera del estudio estaba prohibido.

En el primer grupo, los individuos tratados con REGN727 vía intravenosa, se hicieron subgrupos de 8 personas elegidas de manera aleatoria, de ellos 6 recibirían el fármaco en la dosis mínima testada (0,3 mg por kilogramo de masa corporal) y otros 2 recibiría el placebo. Después de evaluar la seguridad, se incrementó la dosis del fármaco secuencialmente de 1, 3, 6 y 12mg por kilogramo de masa corporal, siguiendo el planteamiento anterior.

Por otro lado los individuos con dosis única de administración subcutánea, seguían el mismo diseño pero incluía 3 aumentos de dosis secuenciales, recibían desde 50mg al principio, 100mg, 150mg y llegaban a un total de 250mg.

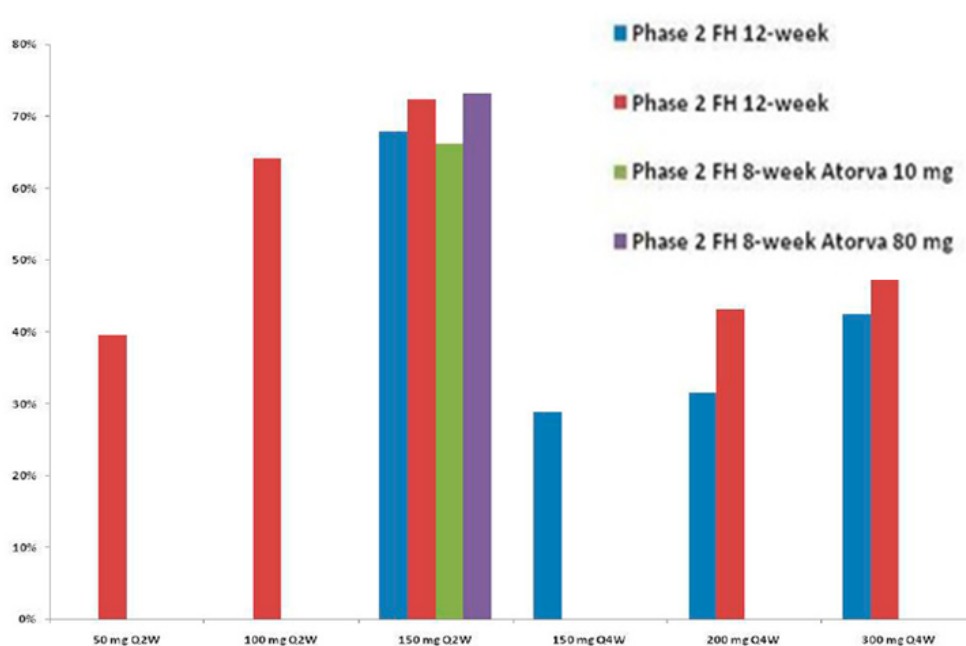
A todos los individuos que participaron en el estudio de dosis única se les extrajo sangre para evaluar los niveles de lípidos séricos los días 1, 2, 4, 8, 11, 15, 22, 29, 43, 64, 85 y 106 del estudio.

4.6.2. Dosis múltiple

El estudio de dosis múltiple incluyó 3 secciones separadas de personas. La primera sección estaba compuesta por 21 individuos con hipercolesterolemia familiar heterocigótica y el segundo por 30 individuos con hipercolesterolemia no familiar. Estos dos grupos ya estaban siendo tratados con atorvastatina y tenían los niveles de LDL plasmático superiores a 100mg/dL. La tercera sección constaba de 10 individuos con hipercolesterolemia no familiar que estaban siendo tratados solo con una modificación de sus hábitos alimenticios y que tenían los niveles de LDL plasmático superiores a 130mg/dL.

Los individuos en el estudio de dosis múltiple fueron aleatoriamente asignados para recibir REGN727 subcutáneo (50, 100 o 150 mg) o placebo administrados en los días 1, 29 y 43.

Fig.13: Descenso medio porcentual desde el inicio del tratamiento con SAR236553/REGN727



Descenso medio porcentual desde el inicio del tratamiento con SAR236553 / REGN727 en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Gencer et al, 2015).

La administración de una única dosis de REGN727 intravenoso o subcutáneo en voluntarios sanos dio como resultado una diferencia desde el inicio hasta el final del ensayo de LDL-c de hasta 65 puntos porcentuales en comparación con el placebo (Fig.13).

En el estudio de dosis múltiple, las dosis de REGN727 de 50mg, 100mg y 150 mg reducen el colesterol LDL medido en los individuos tratados en combinación con atorvastatina, una

diferencia de -39.2, -53.7 y -61.0 puntos porcentuales, respectivamente, en comparación con el placebo.

El grado y la duración de la disminución del colesterol LDL fueron dependientes de la dosis. Dosis más altas produjeron reducciones prolongadas que fueron sostenidas hasta el día 64 del ensayo. Los resultados confirmaron el papel importante de PCSK9 en la regulación de los niveles de colesterol LDL. Además, la demostración de una buena correlación entre una reducción en los niveles de PCSK9 libre y una reducción en los niveles de colesterol LDL después de la administración de REGN727 en humanos respalda los informes previos de estudios con roedores y primates no humanos.

En el estudio se observó que los efectos de REGN727 y atorvastatina en la reducción del colesterol LDL parecían ser aditivos, no sinérgicos, ya que las reducciones porcentuales medias eran similares cuando REGN727 se administraba solo o en individuos que ya recibían atorvastatina. Aunque REGN727 y atorvastatina reducen el colesterol LDL al aumentar la actividad del receptor de LDL del hígado, la atorvastatina lo hace principalmente al mejorar la producción de receptores, mientras que REGN727 disminuye la degradación de receptores. REGN727 indujo un descenso máximo de colesterol LDL en 2 semanas, mientras que las estatinas generalmente necesitan más tiempo.

Las estatinas (atorvastatina) aumentan la expresión de reguladores de esteroides proteína 2 de unión a elementos (SREB2), un factor transcripcional que a su vez potencia la expresión tanto del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLr) como de PCSK9. Esta aparente contrarregulación puede limitar la efectividad de las estatinas por la destrucción de LDLr mediada por PCSK9. Por lo tanto, la tasa de destrucción de LDLr parece ser un determinante importante de los niveles de LDL-c.

La producción de PCSK9 estimulada por estatinas, mientras aparentemente no altera el efecto de disminución de LDL, sí que podría afectar la duración de la acción de anticuerpos terapéuticos, porque mayores tasas de producción de PCSK9 pueden dar como resultado una mayor eliminación de anticuerpo libre. Por lo tanto, la duración de la acción de REGN727 puede ser más larga en sujetos que están tratado con modificación de la dieta solo, que en aquellos tratado con atorvastatina. Por otro lado, los individuos que recibieron tanto REGN727 como atorvastatina, hubo un aumento significativo en los niveles de HDL.

En estos ensayos, no existieron evidencias claras de efectos adversos graves del fármaco. Dado el pequeño número de sujetos y la corta duración de la exposición, la capacidad de evaluar el perfil de seguridad de REGN727 en estos ensayos fue limitado. Se requiere de estudios

adicionales para hacer una evaluación más clara de los posibles efectos adversos de este agente.

En resumen, se evaluaron los efectos de REGN727, un anticuerpo monoclonal completamente humano que bloquea la interacción de PCSK9 con los receptores de LDL. En tres ensayos pequeños de Fase 1 y 2, REGN727 redujo significativamente los niveles de colesterol LDL. Este efecto fue significativo tanto en voluntarios sanos como en sujetos con formas familiares o no familiares de hipercolesterolemia. También es de interés el efecto en sujetos que estaban tomando de manera concomitantemente atorvastatina.

4.7. FÁRMACOS INHIBIDORES DE LA PCSK9

Tras este ensayo de Fase 1 y Fase 2 positivos, se procedió al cambio de nombre de la molécula en cuestión, de nombre de fármaco en estudio a principio activo.

4.7.1. Alirocumab

El principio activo se llamó alirocumab y el nombre comercial Praluent, según su ficha técnica se describe como un anticuerpo monoclonal IgG1 completamente humano que se une con alta afinidad y especificidad a la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9. Ficha técnica: https://ec.europa.eu/health/documents/communityregister/2015/20150923132812/anx_132812_es.pdf

En este caso, en **2014** se publicó el primer estudio de Fase 3 al que se llamó ODISSEY, se trata de un conjunto de ensayos de fase 3, cuya finalidad es una evaluación del beneficio cardiovascular de alirocumab en aproximadamente 18.000 pacientes en un período de 5 años (Moriarty et al., 2014) (Tabla 2).

Tabla 2: Estudio de Fase 3 ODISSEY

NOMBRE DEL ENSAYO	DISEÑO DEL ESTUDIO	NÚMERO DE PACIENTES	DURACIÓN DEL ESTUDIO	LDL-C
ODYSSEY Mono	Pacientes con hipercolesterolemia comparando alirocumab con ezetimiba	103	24 semanas	-31.6
ODYSSEY COMBO I	Pacientes con hipercolesterolemia no controlada y alto riesgo CV.	311	24 semanas	-45.9
ODYSSEY LONG TERM	Pacientes con hipercolesterolemia no controlada con terapia para controlar el nivel de lípidos y alto riesgo CV.	2.341	24 semanas	-61.9

ODYSSEY COMBO: (Kereiakes et al., 2015)

4.7.1.1. *Odissey mono*

El estudio ODYSSEY MONO, fue el primer informe del programa ODYSSEY. Consiste en una serie de estudios de Fase 3 diseñados para proporcionar una evaluación exhaustiva de la eficacia y seguridad de alirocumab en una variedad de entornos clínicos y grupos de pacientes. (Roth et al., 2014)

El primer objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia y seguridad de alirocumab en monoterapia comparada con ezetimiba en pacientes con hipercolesterolemia y riesgo cardiovascular (CV) moderado, que no estaban recibiendo estatinas u otra terapia hipolipemiente.

Ezetimiba fue utilizado como el comparador en este estudio, ya que es una de las opciones recomendadas para tratar pacientes con intolerancia a estatinas. (Millán Núñez-Cortés & Mostaza Prieto, 2016)

Se trató de un estudio de Fase 3, aleatorio, doble ciego, doble-simulado, con pacientes con niveles de LDL-c entre 100-190 mg / dL y riesgo a 10 años de evento cardiovascular fatal $\geq 1\%$, realizado en ocho centros en EE. UU., Bélgica, Finlandia y Países Bajos, de julio de 2012 a julio de 2013.

Los pacientes fueron seleccionados en grupos de manera aleatoria en una proporción de 1: 1 para recibir ezetimiba 10 mg / día por vía oral más placebo de alirocumab administrado por vía subcutánea cada 2 semanas o alirocumab 75 mg vía subcutánea cada dos semanas más placebo oral de ezetimiba a diario. Alirocumab se administraba usando un autoinyector de 1 ml, que el mismo paciente se podía inyectar.

Resultados: Los niveles basales de LDL-c promedio fueron 141.1 (27.1) mg / dL (alirocumab) y 138.3 (24.5) mg / dL (ezetimiba). El período de tratamiento de 24 semanas fue completado por 85% de pacientes con alirocumab y 86% de pacientes con ezetimiba.

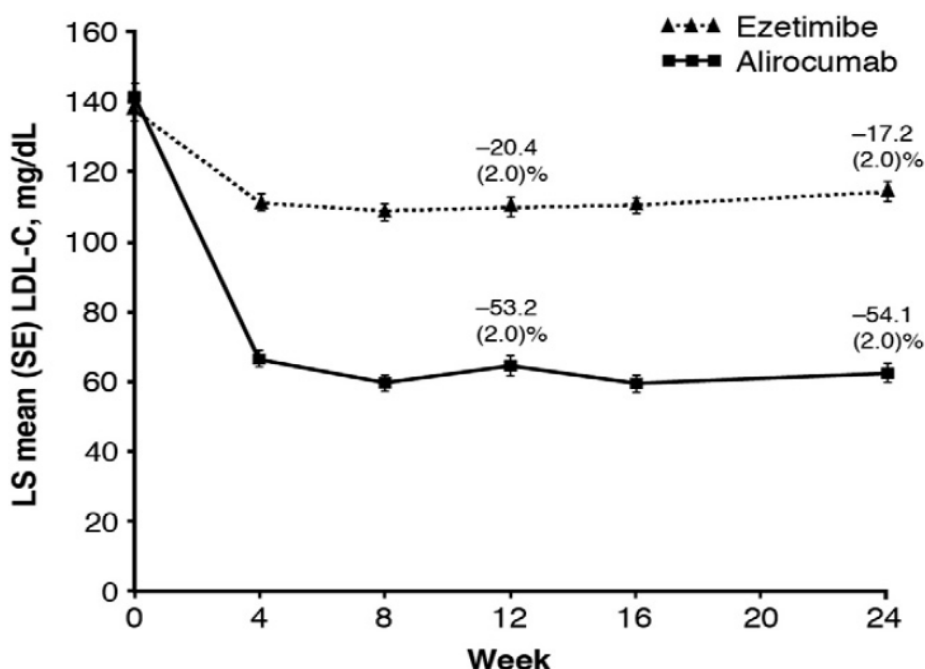
Según el protocolo, los pacientes con alirocumab debían aumentar su dosis de alirocumab a 150 mg en la semana 12, si en su semana 8 su concentración de LDL en plasma era ≥ 100 mg / dL. Sin embargo, debido a un error administrativo durante el estudio, se utilizó un umbral de 70 mg / dL en lugar de 100 mg / dL. Debido a que el estudio era doble ciego, el error no se descubrió hasta que se analizaron los datos después de que el estudio estuvo completo.

En cuanto a los resultados, con alirocumab las reducciones de LDL-c fueron del 47 % frente a un 16% con ezetimiba. En la semana 12, ante el aumento de la dosis de alirocumab los niveles de LDL-c se redujeron un 53%. Si bien el aumento de la dosis de alirocumab se produjo a un nivel de LDL-C inferior al planificado por protocolo (es decir, ≥ 100 mg / dL), no se debería ver afectada la eficacia por esta disminución de los niveles de LDL a los que se produjo el aumento de dosis interviniera significativamente en el estudio.

Las reducciones porcentuales desde los niveles iniciales en Apo B, colesterol total, y colesterol de lipoproteínas de alta densidad no fueron significativamente mayores para alirocumab frente ezetimiba en la semana 24.

Conclusiones: Alirocumab demostró una disminución significativamente mayor de LDLc comparada con ezetimiba después 24 semanas con la dosis más baja de 75 mg suficiente para proporcionar una reducción de LDL-C $\geq 50\%$ en la mayoría de los pacientes. Los eventos adversos fueron comparables entre los grupos. Además alirocumab demostró tolerabilidad y seguridad comparable con ezetimiba. Esta es una observación importante, ya que ezetimiba es una de las opciones recomendadas para uso en pacientes con intolerancia a estatinas debido a su perfil de seguridad favorable (Fig.14).

Fig.14: Cambios en niveles de LDLc durante el estudio



La imagen muestra el curso temporal de los cambios en los niveles de LDL-C sobre el período de estudio para pacientes tratados con alirocumab y ezetimiba. (Roth et al., 2014)

4.7.1.2. *Odissey long term*

En la prueba ODYSSEY LONG TERM el inhibidor de PCSK9, alirocumab se añadió a la terapia con estatinas a la dosis máxima tolerada, en comparación con el placebo, en un ensayo aleatorio de 2341 personas con alto riesgo de evento cardiovascular que tenían niveles de colesterol LDL de 70 mg / dL (1.8 mmol por litro) o más. (Robinson et al., 2015).

Alirocumab redujo los niveles de colesterol LDL en 62 puntos porcentuales, en pacientes de alto riesgo, con o sin otras terapias para reducir los lípidos, el efecto del tratamiento se mantuvo constante durante 78 semanas. Los pacientes fueron asignados aleatoriamente en dos grupos con una proporción de 2: 1 para recibir alirocumab (150 mg) o placebo como una inyección subcutánea de 1 ml cada 2 semanas por 78 semanas, además de su tratamiento normal a dosis máxima de estatinas.

Algunas limitaciones del estudio deben tenerse en cuenta antes de ver los resultados. Primero, aunque en ODYSSEY LONG TERM, se siguió a los pacientes que recibieron terapia con el medicamento de estudio durante un período más largo que la mayoría de los otros ensayos de inhibidores de PCSK9, la duración del seguimiento es aun relativamente corta para un tratamiento descrito para una enfermedad crónica, y se necesitarán estudios a más largo plazo.

Aun así, durante un período de 78 semanas, alirocumab, cuando se agrega a la terapia con estatinas al máximo dosis tolerada, redujo niveles significativamente de colesterol LDL. Además hubo evidencias que la tasa de eventos cardiovasculares adversos (muerte por enfermedad coronaria, infarto de miocardio, fatal o no fatal, accidente cerebrovascular isquémico o angina inestable que requiera hospitalización) fue un 48% menor entre los pacientes que recibieron alirocumab y aquellos que recibieron placebo durante las 80 semanas de seguimiento.

En segundo lugar, la utilidad de los hallazgos neurocognitivos está limitada por la falta de pruebas neurocognitivas formales como parte del diseño del estudio.

En tercer lugar, el número de eventos cardiovasculares fue relativamente pequeño, lo que limita la solidez de los datos y la confianza de que no son simplemente un hallazgo casual.

4.7.2. Evolocumab

Por otro lado, el laboratorio farmacéutico Amgen, (Blom et al., 2017) hizo un estudio en gran profundidad que se publicó en 2007 sobre la estructura cristalina de la PCSK9, lo que le bastó para investigar otro anticuerpo monoclonal anti-PCSK9, este nuevo fármaco se llamó Repatha, principio activo evolocumab, según su ficha técnica es un anticuerpo monoclonal IgG2 humano producido mediante tecnología de ADN recombinante en células ováricas de hámster chino.

Ficha técnica: ec.europa.eu/health/documents/community.../anx_130850_es.pdf

Tabla 3: Resumen estudios Fase 3 evolocumab

NOMBRE DEL ENSAYO CLINICO	DISEÑO DEL ESTUDIO	NÚMERO DE PACIENTES	DURACIÓN DEL ESTUDIO	NIVELES DE LDL-C
DESCARTES	Pacientes con hiperlipidemia: a) dieta hipocalórica+ atorvastatina+ evolocumab b) dieta hipocalórica+ atorvastatina+ ezetimiba+ evolocumab	901	52 semanas	-57.0
LAPLACE-2	Pacientes con hipercolesterolemia: a)Estatinas a alta dosis + evolocumab b)Ezetimiba c)Placebo	2067	12 semanas	De -59,2 a -70.6
GAUSS-2	Pacientes intolerantes a las estatinas. a)Evolocumab b)Ezetimiba	307	12 semanas	De -68.8 a -69.7
RUTHERFORD	Pacientes con HeFH tratados con Evolocumab	329	12 semanas	De -59.2 a -61.3
TESLA PARTE B	Pacientes con HoFH que no estaban con aféresis tratados con Evolocumab	49	12 semanas	-30.9

Descartes: (Blom et al., 2017)/ Gauss-2:(Cho et al., 2016) / Rutherford: (Robinson et al., 2015)/ Tesla B: (Raal et al., 2015)

Este fármaco también tuvo sus estudios correspondientes de fase 3 antes de su comercialización, más tarde se realizó una extensa revisión en junio de 2016 sobre las diferencias entre ambos fármacos (Tabla 3).

4.7.3. Comparación alirocumab vs evolocumab

La comparativa entre estos dos 2 inhibidores de PCSK9 aprobados es necesaria debido a que hay otros en estudio. Y habría que preguntarse sobre el papel de esta nueva clase de medicamentos para el tratamiento de la hipercolesterolemia, y también si de manera comparativa hay importantes diferencias entre ellos. Estos medicamentos serán administrados durante muchos años a la población, son caros, y todavía hay preguntas sobre el beneficio y el daño a largo plazo.

Comparativa de los beneficios y daños de los inhibidores de PCSK9: alirocumab y evolocumab (McDonagh et al, 2016).

El método utilizado para la comparación fueron las bases de datos, las cuales se utilizaron para buscar ensayos controlados aleatorios de alirocumab o evolocumab. La búsqueda en las bases de datos revelaron 17 ensayos de buena calidad; sin embargo, ninguno tuvo resultados de una comparación directa con otros inhibidores (Tabla 4).

Alirocumab (75 mg a 150 mg por vía subcutánea cada 2 semanas) dio como resultado reducciones significativamente mayores en las lipoproteínas de baja densidad colesterol (LDL-C; -8% a -67%) a las 12-24 semanas en pacientes con hipercolesterolemia familiar heterocigótica y pacientes con alto o variado riesgo cardiovascular (CV) en tratamiento con estatinas. Asimismo, produjo un aumento del 6% al 12% en HDL-c (Tabla 4).

Evolocumab (120 mg por vía subcutánea cada 2 semanas a 420 mg cada 4 semanas) produjo reducciones significativamente en LDL-C (-32% a -71%) a las 12-52 semanas en pacientes con hipercolesterolemia familiar heterocigótica u homocigota, pacientes intolerantes a estatinas y pacientes con riesgo cardiovascular variable con terapia con estatinas. Mostró también un aumento en HDL-C de 4.5% -6.8% (Tabla 4).

Tabla 4: Comparación alirocumab vs evolocumab

FÁRMACOS	ESTUDIO	TERAPIA CONCOMITANTE Y DOSIS	DIFERENCIA DE LDL-C
Alirocumab	99sujetos 12semanas	Alta dosis de estatinas + Ezetimiba 151-170mg/dL+ 150mg/200mg/300mg cada 4semanas o 150mg cada 2semanas	De -8,0% a -57,4%
Evolocumab	499sujetos 12semanas	Alta intensidad de estatinas+ Ezetimiba 150-155mg/dL+ 140mg cada 2 semanas o 420mg cada 4semanas	-44,1% a -61,3%
PERSONAS CON ALTO RIESGO CARDIACO INH. PCSK9 VS PLACEBO			
Alirocumab	2.656personas 24semanas	Alta dosis de estatinas 100mg/dL- 123mg/dL + Alirocumab de75 a 150mg cada 2 semanas	-45,9% a -61,9%
Evolocumab	310 personas 12 semanas	Alta dosis de estatinas 139mg/dL+ evolocumab 420mg cada 4 semanas	-60%

Desafortunadamente, la evidencia de los beneficios de salud a largo plazo y daños de los inhibidores de PCSK9, alirocumab y evolocumab es insuficiente para sacar conclusiones en este momento, principalmente debido a la información limitada o nula a largo plazo impacto de las grandes reducciones en LDL-C.

Otra cuestión importante planteada es la comparación de los distintos grupos incluyendo un antihiperlipidémicos concomitante. Claramente, en la terapia escalonada, las opciones frente a un tratamiento inadecuado incluyen continuar para maximizar la terapia actual, agregar un segundo tratamiento, o incluso cambiar el tratamiento farmacológico. Es cierto que los inhibidores de PCSK9 es probable que funcionen mejor cuando se usan junto con una

estatinas, y la mayoría de los estudios continúan la terapia con estatinas en pacientes tratados con inhibidores de PCSK9. Una comparación justa, entonces, sería maximizar la terapia con estatinas (es decir, usando alta intensidad estatinas y / o dosis máximamente toleradas) en el grupo de control en particular. La mayoría de estos estudios no se adhieren a esta norma. En consecuencia, se requieren estudios futuros para determinar los verdaderos beneficios de los inhibidores PCSK9.

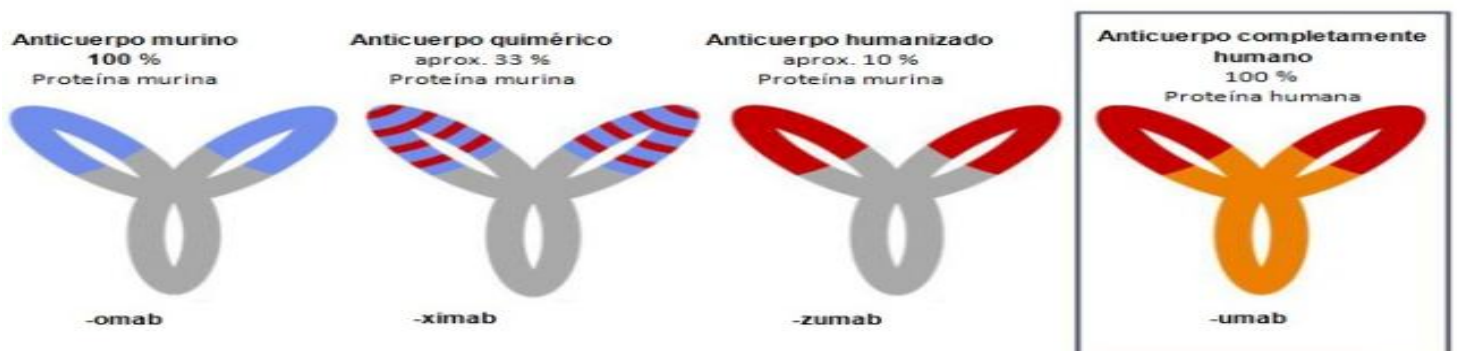
Cuando los pacientes en tratamiento con estatinas no tienen un alto riesgo cardiovascular, posibilidad de tener un accidente CV en menos de 10 años, pero sí unos niveles de LDL-C altos se pueden lograr grandes reducciones en LDL-C y mayor proporción de pacientes que logran reducir en gran medida estos niveles. Sin embargo, con las recientes directrices que sugieren que la terapia debe ser dirigida por el nivel de riesgo y no objetivos LDL-C específicos, es menos claro cómo interpretar y aplicar los hallazgos de estos estudios.

Por último, se puede llegar a la conclusión, que la evidencia es mayor para alirocumab que evolocumab en pacientes con alto riesgo cardiovascular no a LDL-C objetivo, mientras que la evidencia de evolocumab es más fuerte en pacientes con hipercolesterolemia familiar heterocigótica. Además, todavía quedan preguntas importantes sobre los efectos comparativos de cualquiera de los medicamentos en los resultados de salud a largo plazo y sobre todo coste-efectivos.

4.7.4. Bococizumab

El último fármaco de la familia de inhibidores de PCSK9 conocido es bococizumab de laboratorios Pfizer, los resultados de sus ensayos clínicos están agrupados en SPIRE 1 Y 2. Bococizumab , que como los anteriores demuestra que atenúa los niveles de LDL-c, planteó problemas debido a los anticuerpos que generan los pacientes frente al fármaco, lo que genera un descenso menor del LDL-c que sus dos hermanos, los cuales no presentan este problema de inmunogenicidad (Ridker et al., 2017) (Fig.15).

Fig.15: Tipos de anticuerpos monoclonales



<https://www.pcsk9.es/anticuerpos-monoclonales>

El motivo de la diferencia entre bococizumab y los otros dos fármacos probablemente se deba al hecho de que bococizumab es un anticuerpo monoclonal parcialmente murino, en tanto que alirocumab y evolocumab son completamente humanizados (Fig.15).

Bococizumab en SPIRE-2 redujo los eventos cardiovasculares en pacientes con concentraciones de LDL > 100 mg/dL, que fueron objeto de seguimiento durante un periodo prolongado.

Sin embargo, el fármaco no tuvo ningún efecto sobre los eventos cardiovasculares en SPIRE-1, que incluyó a pacientes con concentraciones de LDL más bajas (> 70 mg/dl), quienes fueron objeto de seguimiento por un periodo más breve.

En todo el programa de bococizumab, los anticuerpos contra el fármaco se formaron en casi la mitad (48%) de los pacientes que recibieron bococizumab y los anticuerpos neutralizantes aparecieron en 29%. Los autores manifiestan que esto atenuó sustancialmente la reducción de las LDL en el curso del tiempo en algunos pacientes afectados. Asimismo, puntualizan que hubo una amplia variabilidad en la reducción de las LDL, alcanzada con Bococizumab, en pacientes que no formaron anticuerpos.

<https://espanol.medscape.com/verarticulo/5901330>

4.8. NUEVAS VÍAS DE INVESTIGACIÓN DE PCSK9

En este último año, **2018**, se está investigando sobre PCSK9 y su posible implicación en otras enfermedades. Un ejemplo de estas nuevas vías de investigación es el estudio llevado a cabo en África, sobre la posible influencia del polimorfismo de PCSK9, en particular de **E670G**, en la mayor incidencia de Plasmodium spp. (Arama et al., 2018)

Todo comienza debido a que la proliferación e infectividad de Plasmodium spp. depende parcialmente del colesterol del hospedador. Existe la posibilidad de que los polimorfismos genéticos de PCSK9 puedan influir en el curso de la infección de la malaria. Se analizó la distribución de un polimorfismo dominante (**C679X**) y dos polimorfismos recesivos (**A443T**, **I474V**) hipocolesterolémicos, así como un polimorfismo hipercolesterolémico recesivo (**E670G**) entre niños malienses infectados por malaria y sanos.

Se recolectaron muestras de sangre de 752 niños de Bandiagara, Mali. De estas, 253 muestras eran de niños sanos, 246 de pacientes con malaria no complicada y 253 pacientes con malaria severa. Además su ADN genómico fue extraído y genotipado para lo distinguir los distintos polimorfismos de PCSK9. Se evaluaron los distintos genotipos y frecuencias alélicas con la incidencia de la malaria en los individuos.

El resultado de la evaluación fue una frecuencia de los polimorfismos **A443T**, **I474V**, **E670G** y **C679X** en la muestra de la población de estudio muy baja, de 0.12, 0.20, 0.26 y 0.02, respectivamente. Además la distribución de estos polimorfismos entre sanos, con malaria no complicada y con malaria severa, fue estadísticamente insignificante. Sin embargo, para el polimorfismo hipercolesterolémico **E670G**, se mostró una tendencia hacia la asociación de este polimorfismo con mayor severidad de la malaria.

El polimorfismo **E670G** se encuentra en el dominio CRD de PCSK9, dominio rico en histidina. La sustitución de Glutámico cargado por una Glicina neutra en la posición 670 aumenta la actividad y altera la conformación de PCSK9. Se observa en este estudio que los portadores son en su mayoría varones, y se constata que había más individuos con esta mutación entre los pacientes con malaria grave que entre pacientes sanos. Estas observaciones son solo el principio se requieren más estudios que incluyan perfiles lipídicos para verificar si la hipercolesterolemia crónica vinculada a **E670G** está asociada a un mayor riesgo de malaria severa.

5. CONCLUSIONES

1. La PCSK9 tiene numerosas aplicaciones dentro del campo farmacéutico, debido a su capacidad reguladora en el número de receptores de LDL. La PCSK9 puede modificar los niveles de LDL en personas con hipercolesterolemia, teniendo un futuro prometedor en las nuevas terapias hipolipemiantes.

2. Las mutaciones de esta proteína, tanto de pérdida como de ganancia de función, han servido para poder dilucidar esta nueva diana farmacológica, esclareciendo cómo en algunos casos los altos o bajos niveles de LDL de cierta población no eran una mera adquisición, sino debidos a la mutación en esta proteína.

3. Son numerosos los posibles fármacos que se pueden obtener como inhibidores de la PCSK9. Sin embargo, hay que determinar su beneficio en función de su coste-efectividad a medio/largo plazo. Son fármacos costosos que serán necesarios en la terapia de un gran número de pacientes durante un largo periodo de tiempo, por tanto tienen que ser altamente eficaces para poder hacer frente al gasto económico.

4. A pesar de las numerosas ventajas que pueden aportar la utilización de inhibidores de la PCSK9 como fármacos, es muy reducido el número de ensayos que incluyen efectos a largo plazo, solo hace 6 años que se hizo el primer ensayo clínico del primer fármaco. Por tanto sería adecuado el seguimiento a los pacientes tratados para demostrar su seguridad a largo plazo.

5. Las nuevas líneas de investigación abren un camino al posible descubrimiento de nuevas aplicaciones de esta proteína.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abifadel, M., Varret, M., Rabès, J. P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., ... Boileau, C. (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nature Genetics*, 34(2), 154–156. <https://doi.org/10.1038/ng1161>

Este es el artículo más importante, en mi opinión, porque describe el comienzo en la búsqueda de PCSK9 como responsable de la hipercolesterolemia autosomal dominante

Arama, C., Diarra, I., Kouriba, B., Sirois, F., Fedoryak, O., Thera, M. A., ... Mbikay, M. (2018). Malaria severity: Possible influence of the E670G PCSK9 polymorphism: A preliminary case-control study in Malian children. *PLoS ONE*, 13(2), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192850>

Este artículo es el más reciente, de este mismo año, y trata sobre las nuevas vías de investigación entorno a la malaria

Benjannet, S., Rhainds, D., Essalmani, R., Mayne, J., Wickham, L., Jin, W., ... Seidah, N. G. (2004). NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: Zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 48865–48875. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409699200>

Blom, D. J., Koren, M. J., Roth, E., Monsalvo, M. L., Djedjos, C. S., Nelson, P., ... Holman, R. R. (2017). Evaluation of the efficacy, safety and glycaemic effects of evolocumab (AMG 145) in hypercholesterolaemic patients stratified by glycaemic status and metabolic syndrome. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 19(1), 98–107. <https://doi.org/10.1111/dom.12788>

Cho, L., Rocco, M., Colquhoun, D., Sullivan, D., Rosenson, R. S., Dent, R., ... Stroes, E. (2016). Clinical Profile of Statin Intolerance in the Phase 3 GAUSS-2 Study. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 30(3), 297–304. <https://doi.org/10.1007/s10557-016-6655-4>

Cohen, J. C., Boerwinkle, E., Mosley, T. H., & Hobbs, H. H. (2006). Sequence Variations in. *Heart Disease*, 1264–1272.

Cohen, J., Pertsemlidis, A., Kotowski, I. K., Graham, R., Garcia, C. K., & Hobbs, H. H. (2005). Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nature Genetics*, 37(2), 161–165. <https://doi.org/10.1038/ng1509>

Corral, P., Suter, A., Rusconi, A., & Trigo, L. (2016). Inhibidores de proproteína convertasa subtilisina Revisión y puesta al día farmacológica, 11(3), 122–129.

Evan A. Stein, M.D., Ph.D., Scott Mellis, M.D., P. D., & George D. Yancopoulos, M.D., Ph.D., Neil Stahl, Ph.D., Douglas Logan, M.D., William B. Smith, M.D., Eleanor Lisbon, M.D., M.P.H., Maria Gutierrez, M.D., Cheryle Webb, M.D., Richard Wu, Ph.D., Yunling Du, Ph.D., Therese Kranz, R.N., M.B.A., Evelyn Gasparin, P. D. (2012). c o r r e s p o n d e n c e Effect of a Monoclonal Antibody to PCSK9 on LDL Cholesterol, 2425–2426.

Este artículo, también es muy importante, relata la primera prueba del fármaco en personas.

Frank-Kamenetsky, M., Grefhorst, A., Anderson, N. N., Racie, T. S., Bramlage, B., Akinc, A., ... Fitzgerald, K. (2008). Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(33), 11915–11920. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805434105>

- Gencer, B., Lambert, G., & Mach, F. (2015). PCSK9 inhibitors. *Swiss Medical Weekly*, 145(April), 1–9. <https://doi.org/10.4414/smw.2015.14094>
- Goldberg, A. C. (2010). Novel therapies and new targets of treatment for familial hypercholesterolemia. *Journal of Clinical Lipidology*, 4(5), 350–356. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2010.08.015>
- Graham, M. J., Lemonidis, K. M., Whipple, C. P., Subramaniam, A., Monia, B. P., Crooke, S. T., & Crooke, R. M. (2007). Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. *Journal of Lipid Research*, 48(4), 763–767. <https://doi.org/10.1194/jlr.C600025-JLR200>
- Hampton, E. N., Knuth, M. W., Li, J., Harris, J. L., Lesley, S. A., & Spraggon, G. (2007). The self-inhibited structure of full-length PCSK9 at 1.9 Å reveals structural homology with resistin within the C-terminal domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(37), 14604–14609. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703402104>
- Este artículo es polemico, ya que gracias a él Novartis ha podido desarrollar su fármaco y esquivar la patente de Sanofi.***
- Horton, J. D., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (2007). Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(2), 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.12.008>
- Kathiresan, S. (2008). A PCSK9 Missense Variant Associated with a Reduced Risk of Early-Onset Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine*, 358(21), 2299–2300. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0707445>
- Kereiakes, D. J., Robinson, J. G., Cannon, C. P., Lorenzato, C., Porady, R., Chaudhari, U., & Colhoun, H. M. (2015). Efficacy and safety of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitor alirocumab among high cardiovascular risk patients on maximally tolerated statin therapy: The ODYSSEY COMBO i study. *American Heart Journal*, 169(6), 906–915. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2015.03.004>
- Kwon, H. J., Lagace, T. A., McNutt, M. C., Horton, J. D., & Deisenhofer, J. (2008). Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), 1820–1825. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712064105>
- Lambert, G., Charlton, F., Rye, K. A., & Piper, D. E. (2009). Molecular basis of PCSK9 function. *Atherosclerosis*, 203(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.06.010>
- Maxwell, K. N., & Breslow, J. L. (2004). Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(18), 7100–7105. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402133101>
- McDonagh, M., Peterson, K., Holzhammer, B., & Fazio, S. (2016). A Systematic Review of PCSK9 Inhibitors Alirocumab and Evolocumab. *Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy*, 22(6), 641–653q. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2016.22.6.641>
- Millán Núñez-Cortés, J., & Mostaza Prieto, J. M. (2016). Fármacos hipolipemiantes y PCSK9. *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis*, 28(Supl 2), 9–13. [https://doi.org/10.1016/S0214-9168\(16\)30165-6](https://doi.org/10.1016/S0214-9168(16)30165-6)
- Moriarty, P. M., Jacobson, T. A., Bruckert, E., Thompson, P. D., Guyton, J. R., Baccara-Dinet, M. T., & Gipe, D. (2014). 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*, 8(6), 554–561. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2014.09.007>

Pedro-Botet, J., & Badimón, L. (2016). PCSK9: estructura y función. PCSK9 y receptor de lipoproteínas de baja densidad. Mutaciones y cambios derivados de estas. *Clinica e Investigacion En Arteriosclerosis*, 28(Supl 2), 3–8. [https://doi.org/10.1016/S0214-9168\(16\)30164-4](https://doi.org/10.1016/S0214-9168(16)30164-4)

Peterson, A. S., Fong, L. G., & Young, S. G. (2008). PCSK9 function and physiology,: Fig. 1. *Journal of Lipid Research*, 49(6), 1152–1156. <https://doi.org/10.1194/jlr.E800008-JLR200>

Piper, D. E., Jackson, S., Liu, Q., Romanow, W. G., Shetterly, S., Thibault, S. T., ... Walker, N. P. C. (2007). The Crystal Structure of PCSK9: A Regulator of Plasma LDL-Cholesterol. *Structure*, 15(5), 545–552. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.04.004>

Este artículo me sirvió para entender la estructura tridimensional de PCSK9

Poirier, S., & Mayer, G. (2013). The biology of PCSK9 from the endoplasmic reticulum to lysosomes: New and emerging therapeutics to control low-density lipoprotein cholesterol. *Drug Design, Development and Therapy*, 7, 1135–1148. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S36984>

Raal, F. J., Honarpour, N., Blom, D. J., Hovingh, G. K., Xu, F., Scott, R., ... Stein, E. A. (2015). Inhibition of PCSK9 with evolocumab in homozygous familial hypercholesterolaemia (TESLA Part B): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 385(9965), 341–350. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61374-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61374-X)

Ridker, P. M., Revkin, J., Amarenco, P., Brunell, R., Curto, M., Civeira, F., ... Tardif, J.-C. (2017). Cardiovascular Efficacy and Safety of Bococizumab in High-Risk Patients. *New England Journal of Medicine*, 376(16), 1527–1539. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1701488>

Robinson, J. G., Farnier, M., Krempf, M., Bergeron, J., Luc, G., Aversa, M., ... Kastelein, J. J. P. (2015). Efficacy and Safety of Alirocumab in Reducing Lipids and Cardiovascular Events. *New England Journal of Medicine*, 372(16), 1489–1499. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1501031>

Roth, E. M., Taskinen, M. R., Ginsberg, H. N., Kastelein, J. J. P., Colhoun, H. M., Robinson, J. G., ... Baccara-Dinet, M. T. (2014). Monotherapy with the PCSK9 inhibitor alirocumab versus ezetimibe in patients with hypercholesterolemia: Results of a 24 week, double-blind, randomized Phase 3 trial. *International Journal of Cardiology*, 176(1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.06.049>

S.Wook Park, Moon, Y. A., & Horton, J. D. (2004). Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 50630–50638. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410077200>

Seidah, N. G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S. B., Stifani, S., ... Chretien, M. (2003). The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): Liver regeneration and neuronal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(3), 928–933. <https://doi.org/10.1073/pnas.0335507100>