КОРРЕКЦИЯ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИСЕНС-ТЕХНОЛОГИЙ

О.И. Афанасьева*, С.Н. Покровский

Российский кардиологический научно-производственный комплекс
121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

Обсуждают использование антисмысловых олигонуклеотидов (АСО) для разработки препаратов для коррекции нарушений липидного обмена. Анализируют основные типы АСО и механизмы их действия на целевую мРНК. Рассматривают достоинства и недостатки различных АСО с точки зрения требований для их терапевтического применения.

Описывают методы химической модификации олигонуклеотидов; преимущества и недостатки различных способов доставки АСО препаратов в клетки; состояние разработок крупнейшими фармакологическими компаниями АСО препаратов для коррекции нарушений липидного обмена; данные, полученные при проведении клинических испытаний таких препаратов.

Ключевые слова: антисенс-терапия, антисмысловые олигонуклеотиды, нарушение липидного обмена, сердечно-сосудистые заболевания.

Рациональная фармакотерапия в кардиологии 2013;9(5):532-541

Lipid metabolism correction by antisense technology

O.I. Afanasieva*, S.N. Pokrovsky

Russian Cardiology Research and Production Complex. Tretya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

Antisense oligonucleotides (ASO) technology in elaboration of drugs for lipid metabolism correction is discussed. The main ASO types and modes of its action on the target mRNA are analyzed. Advantages and disadvantages of different ASO are considered in the context of requirements for their therapeutic applications.

Methods of ASO chemical modification; advantages and disadvantages of different ways of ASO delivery into the cells; developments state of ASO-drugs for therapy of lipid metabolism disturbances; data from clinical trials of these drugs are described.

Key words: antisense therapy, antisense oligonucleotides, lipid metabolism disturbances, cardiovascular disease.

Ration Pharmacother Cardiol 2013;9(5):532-541

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): afanasieva@cardio.ru

Введение

Несмотря на успехи современной кардиологии, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются ведущей причиной смерти во всем мире. Антисенс-терапия – метод лечения, основанный на ингибировании синтеза белка, участвующего в развитии заболевания, путем блокирования трансляции его матричной РНК (мРНК) с помощью комплементарных к ней коротких нуклеотидных последовательностей антисенс-олигонуклеотидов (АСО). Данный метод открывает широкие перспективы для создания нового поколения препаратов для лечения ССЗ.

Ряд крупных биотехнологических и фармацевтических компаний активно разрабатывают несколько препаратов для лечения сердечно-сосудистых, неврологических, онкологических заболеваний и вирусных инфекций, используя антисенс-технологии [1, 2].

Несмотря на то, что принципы технологии на основе АСО предложены в конце 60-х годов прошлого века, активное развитие данного направления применительно к терапии различных заболеваний началось относительно недавно. Единственным препаратом на основе АСО, одобренным Управлением по контролю ка-

чества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA), является препарат Fomiversen для лечения цитомегаловирусного ретинита [3]. В настоящее время в разработке и на разных стадиях клинических испытаний находятся более 40 новых препаратов на основе АСО.

Согласно липидной теории патогенеза атеросклероза ведущей причиной ишемической болезни сердца (ИБС), инсультов, нарушения кровообращения периферических сосудов является нарушение метаболизма липидов [4]. Несмотря на применение статинов как препаратов первого ряда для медикаментозной коррекции нарушения метаболизма липидов часть больных подвержены «остаточному риску» развития атеросклероза, который, в свою очередь, может быть связан с дислипидемией, не корректируемой статинами [5].

Согласно результатам международных и наших собственных исследований, повышенный уровень липопротеида(а) [Лп(а)] является фактором риска развития атеросклероза и сердечно-сосудистых осложнений, особенно у лиц молодого и среднего возраста [6-8]. Существующие медикаментозные препараты не оказывают воздействия на концентрацию Лп(а), за исключением препаратов никотиновой кислоты замедленного высвобождения, но и их эффективность не превышает 30% [6,9].

Липидный обмен человека регулируется многими генами, большинство из которых могут являться потенциальными мишенями для терапии [10, 11]. По-

Сведения об авторах:

Афанасьева Ольга Ильинична – д.б.н., в.н.с. лаборатории проблем атеросклероза института экспериментальной кардиологии РКНПК

Покровский Сергей Николаевич – д.б.н., профессор, руководитель той же лаборатории

вышенная концентрация триглицеридов (ТГ), триглицерид-богатых ремнантов, мелких и плотных подфракций липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) [12, 13] являются дополнительными факторами риска развития атеросклероза.

Апобелок С-III участвует в метаболизме ТГ по нескольким механизмам, при этом, по данным ряда клинических исследований, уровень апоСIII оказался лучшим предиктором ССЗ, чем уровень ТГ, что делает ген этого белка перспективной мишенью для терапевтического воздействия через АСО [14].

Другой возможной целевой молекулой для терапии, непосредственно вовлеченной в метаболизм липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) – основного антиатерогенного класса липопротеидов – является ген белка-переносчика эфиров холестерина (СЕТР), обеспечивающий обмен эфиров холестерина между ЛПВП и апоВ-содержащими липопротеидами [15].

Значительное число сердечно-сосудистых событий, происходящих у лиц без традиционных факторов риска, приводит исследователей к пониманию того, что множество генетических, регуляторных и экологических факторов также способствуют нарушению правильного метаболизма липопротеидов, нарушению обмена веществ и возникновению атеротромбоза [16]. В настоящем обзоре дано описание механизмов воздействия АСО и приведены примеры использования препаратов на основе антисенс-технологий для коррекции нарушений метаболизма липидов.

Механизмы действия антисенс-олигонуклеотидов

АСО определяются как олигонуклеотиды длиной от 8 до 50 нуклеотидов, которые целиком или частично связываются с РНК по механизму Ватсона-Крика (рис. 1) и препятствуют дальнейшей трансляции мРНК в белок. Под это определение попадает широкий спектр олигонуклеотидных конструкций, которые воздействуют на целевую РНК при помощи нескольких механизмов.

АСО могут воздействовать на целевую мРНК, не вызывая ее деградации или, наоборот, способствуя деградации мРНК с помощью эндогенных ферментов, рибозимов или других механизмов расщепления. При этом механизм воздействия на целевую мРНК определяется как структурой самого олигонуклеотида, так и расположением комплементарного АСО-участка на мРНК-мишени [1].

Антисенс-олигонуклеотиды, вызывающие расщепление целевой мРНК

Наиболее широко используемым классом АСО являются олигонуклеотиды, действующие с использованием эндогенных ферментативных путей деградации – эндорибонуклеаз, специфичных к мРНК, находящихся в составе двухцепочечных РНК (РНКазы III) или РНК/ДНК

Рисунок 1. Принцип взаимодействия антисмысловых олигонуклеотидов с целевой молекулой мРНК по механизму Ватсона-Крика (адаптировано из Bennett 2010 [1])

гетеродуплексов (РНКазы Н). Расщепление мРНК происходит в ядре клетки после попадания туда одноцепочечных АСО и образования двухцепочечного участка на мРНК, являющегося субстратом для эндонуклеаз, в частности, для РНКазы Н [17]. В настоящее время более 20 препаратов, разрабатываемых для терапевтического применения фирмой Isis Pharmaceuticals Inc., обладают именно таким механизмом воздействия на мРНК-мишени.

Другим ферментативным механизмом, приводящим к расщеплению целевой молекулы, является РНК-интерференция. В природе система РНК-интерференции играет важную роль в защите клеток от вирусов, паразитирующих генов, а также в регуляции развития, дифференцировки и экспрессии генов организма. РНК-интерференция запускается короткими (21-25 нуклеотидов) двухцепочечными (дц) олигонуклеотидами – эндогенными микроРНК (microRNA, далее

miРНК) или экзогенными малыми интерферирующими РНК (small interfering RNA, далее – siРНК), обладающими характерной структурой, образуемой в результате действия фермента Dicer [18]. В процессе РНК-интерференции расщепление целевой мРНК-мишени происходит в цитоплазме клетки с участием siРНК или miРНК посредством ферментативного белкового комплекса RISC (RNA-induced silencing complex), в состав которого входит белок Argonaute (Ago) [19], одна из субъединиц которого образует структуру, подобную РНКазе H [1]. После связывания siРНК или miРНК с комплексом RISC происходит их расщепление, при котором в составе комплекса остается только одна антисенс-цепь, комплементарная мРНК-мишени. Специфическое взаимодействие такого активированного комплекса с целевой мРНК приводит к ее расщеплению в участке связывания и последующей деградации мРНК [20].

Малые интерферирующие РНК (siРНК) представляют собой дцРНК длиной 21-25 нуклеотидов, образующиеся из длинных дцРНК или коротких шпилечных РНК в результате действия на них эндонуклеазы Dicer. siРНК, как правило, точно спариваются с мишенью и приводят к эндонуклеолитическому расщеплению одной специфической мРНК.

МикроРНК обычно образуется как продукт собственного генома. Расщепление целевой РНК, опосредованное miРНК, по механизму РНК-интерференции имитирует естественный путь, по которому miРНК регулируют экспрессию различных генов [21]. Эти эндогенные РНК первоначально синтезируются в виде длинных одноцепочечных РНК (так называемые pri-miРНК), содержащих шпильки. В ядре клетки фермент Drosha вырезает такие двухцепочечные структуры длиной 60-70 нуклеотидов непосредственно во время транскрипции, образуя так называемые pre-miРНК, после чего они транспортируются в цитоплазму. Далее под действием фермента Dicer они расщепляются на miРНК, которые представляют собой также двухцепочечные РНК длиной 21-22 нуклеотида с двумя неспаренными основаниями на 3'-концах. У животных miРНК обычно имеют неполную комплементарность к мРНК-мишени. Для miРНК-опосредованного расщепления целевой РНК необходима гибридизация от 6 до 8 нуклеотидов на 5'-конце олигонуклеотида, так называемый «seed region», с последовательностью, которая встречается преимущественно в 3'-нетранслируемой области мРНК. После образования комплекса происходит либо расщепление мРНК, либо ингибирование трансляции за счет образования неактивного комплекса мРНК RISC [18, 22]. Вследствие неполной комплементарности одна miРНК может регулировать сотни различных мРНК [23]. Поэтому АСО, действующие по механизму РНК-интерференции с участием

miРНК, могут приводить к деградации многочисленных транскриптов.

Антисенс-олигонуклеотиды, действующие без деградации целевой мРНК

Блокировка трансляции мРНК олигонуклеотидами является прототипом антисенс-механизмов и часто упоминается как угнетение трансляции или гибридизации. Такие олигонуклеотиды, как правило, направлены на участок связывания или примыкающий к нему участок инициации трансляции мРНК. Предполагают, что они способны блокировать либо сканирование 40S субъединицей транскрипта, либо сборку 40S и 60S рибосомных субъединиц, или движение рибосомы по транскрипту, когда сборка уже произошла, как это происходит в случае miРНК.

Несмотря на результаты, полученные в опытах *in vitro* в бесклеточной среде, нет подтверждения актуальности данного механизма угнетения трансляции в клеточной культуре или в опытах *in vivo*. В связи с этим, а также в связи с трудностью определения фармакологической активности таких АСО, механизм угнетения трансляции практически не используется при разработке лекарственных препаратов, но достаточно востребован в качестве исследовательского инструмента [24]. Подавление активности теломеразы с помощью АСО, комплементарных теломерной последовательности, может быть востребовано при разработке антираковых препаратов [25]. Блокирование активности собственных miРНК организма, регулирующих экспрессию различных белков или выступающих в качестве онкогенов, также находит применение в разработке терапевтических препаратов [26].

Сравнение различных механизмов действия антисенс-олигонуклеотидов

Все известные механизмы действия АСО могут быть использованы для разработки эффективных препаратов для исследовательских или терапевтических целей, хотя каждый из них имеет свои достоинства и недостатки.

Одноцепочечные олигонуклеотиды, модифицированные тиофосфатными группами, могут иметь фармакокинетические преимущества по сравнению с немодифицированными олигонуклеотидами или двухцепочечными siРНК, поскольку легче проникают в ткани и захватываются клетками без необходимости использования векторов. Использование двухцепочечных олигонуклеотидов, действующих по механизму РНК-интерференции, требует дополнительной модификации или использования липофильных конъюгатов для эффективной доставки в ткани, что увеличивает сложность процесса и общую стоимость препарата [1, 27]. При этом способность siРНК проявлять активность уже непосредственно в цитоплазме клетки, а не в ядре, а также

использование природного механизма регуляции генов делают эти подходы достаточно перспективными.

В последние несколько лет siРНК стали одним из самых привлекательных инструментов антисенс-технологий для разработки стратегии борьбы с различными заболеваниями и нарушениями на генетическом уровне. Полный геном человека и данные об изменении экспрессии отдельных генов при различных заболеваниях служат для исследователей библиотекой для создания дизайна siРНК, способного эффективно подавлять экспрессию целевого гена [28].

Проблемы стабилизации и доставки препаратов антисенс-олигонуклеотидов в клетки

Несмотря на длительный период использования АСО для исследовательских целей, активное развитие данного направления применительно к терапии различных заболеваний началось относительно недавно. Открывшиеся перспективы использования АСО как терапевтических препаратов было связано с успехами в исследовании подходов для стабилизации препаратов АСО и доставки их в клетки.

Немодифицированные олигонуклеотиды, также как и ДНК и РНК, крайне нестабильны в биологических системах, быстро разрушаются под действием нуклеаз, что обуславливает невозможность использовать нестабилизированные олигонуклеотиды как лекарственные препараты. Также не позволяет рассматривать их как терапевтические препараты фармакокинетику РНК и ДНК, поскольку они слабо связываются с белками плазмы крови, быстро фильтруются почками и выводятся с мочой. Химическая модификация АСО помогла придать АСО свойства, обеспечивающие возможность использования их как терапевтических препаратов, таких как устойчивость к деградации эндо- и экзонуклеазами, высокое сродство и специфичность связывания с комплементарной мРНК-мишенью, способность активировать РНКазу H, разрушающую РНК-цепь в составе АСО-мРНК дуплекса, эффективность проникновения в клетку, удовлетворительные фармакокинетические и фармакодинамические свойства.

Для широкого использования АСО модификации нуклеотидов должны сохранять и, предпочтительно, повышать способность связывания АСО с мРНК-мишенью. При этом было замечено, что ряд модификаций, улучшающих связывание АСО с мРНК ухудшают субстратные свойства комплекса относительно эндогенных нуклеаз. Поэтому при оптимизации олигонуклеотидных конструкций для разработки лекарственных препаратов проводится всестороннее изучение эффектов модификации на различные аспекты действия АСО. Многочисленные исследования в области химической модификации АСО фактически привели к созданию трех поколений АСО, использующих различные модифи-

кации олигонуклеотидов по остаткам рибозы, азотистых оснований и фосфатной группы.

В первом поколении устойчивость к нуклеазам обеспечивалась модификацией фосфодиэфирной связи – замещение кислорода на серу (фосфотиоаты), метильную группу (метил-фосфонаты) или амин (фосфороамидаты), что позволяло повысить устойчивость препаратов к эндонуклеазам, при этом не ухудшались субстратные свойства комплекса относительно нуклеазы H, но затруднялось связывание АСО с целевой мРНК [26]. Кроме того, такие препараты АСО плохо проникали в клетку и имели очень ограниченный спектр распределения в органах и тканях. Препараты второго поколения были модифицированы по 2' положению рибозы путем введения 2'-О-метильной, 2'-О-метоксиэтильной или аминопропильной группы [26]. Такая модификация позволяла повысить устойчивость к эндонуклеазам и снизить токсичность препарата, но ухудшала субстратные свойства дуплекса с целевой мРНК относительно РНКазы H. Комбинация двух модификаций позволила получить АСО, обладающие хорошей специфичностью, селективностью и аффинностью к целевой молекуле. Химерные АСО, использующие одновременно фосфотиоатные и 2'-О-метоксиэтил или 2'-О-метил-модификации легли в основу большинства препаратов, разрабатываемых крупнейшими фармацевтическими компаниями.

Наиболее разнообразные модификации используются для создания третьего поколения АСО – морфолино-фосфороамидиты, пептидонуклеиновые (PNA) и конформационно блокированные (LNA) нуклеиновые кислоты. С использованием АСО третьего поколения успешно разрабатываются несколько новых противоопухолевых препаратов, вышедшие на I и/или II фазу клинических исследований [1]. Кроме того, LNA модифицированные siРНК оказываются в опытах *in vivo* более стабильными и эффективными, чем немодифицированные [29].

Доставка АСО непосредственно к определенному типу клеток, тканей или органов является одним из факторов, наиболее лимитирующих внедрение антисенс-технологий в практическую медицину [30]. Гидрофильный характер и анионный состав олигонуклеотидов с молекулярной массой от 4,5 до 18 кДа существенно затрудняет транспортировку АСО в естественных условиях непосредственно в ядро клетки для связи с целевой РНК. Поэтому способ доставки АСО имеет ключевое значение для фармакологической активности препарата. Одним из самых разработанных и перспективных подходов для доставки АСО при лечении хронических заболеваний, требующих долгосрочного подавления гена-мишени, является доставка АСО в клетки-мишени в составе вирусных частиц. Эти частицы включают вирусные оболочки, полученные из ленти-

вируса или аденовируса, которые содержат гемагглютинин, ответственный за связывание и слияние с клеточными мембранами. Вирусные частицы, содержащие siРНК, попадают внутрь также с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза, что помогает избежать деградации в эндосомах и обеспечивает высокую эффективность такого способа доставки [31, 32].

Однако, потенциальная мутагенность и онкогенность, ограниченная емкость загрузки вируса АСО-препаратом, достаточно высокие издержки при производстве, и, самое главное, риски безопасности, вызванные воспалительными и иммуногенными эффектами на повторное введение вирусов, значительно ограничивают их возможное применение [33].

На сегодняшний день известны несколько подходов, позволяющих повысить эффективность доставки АСО в клетки *in vivo* – инкапсулирование АСО в катионные липосомы, дендримеры, наночастицы, позволяющие использовать рецептор-опосредованный эндоцитоз через покрытие поверхности этих носителей различными лигандами и рецепторами – трансферрина, асиалогликопротеина, α -фетопропротеина, которые резко увеличивают селективность и эффективность доставки [34].

Достижения в области разработки новых методов доставки позволили решить вопрос с системной доставкой препаратов. С 2008 г. количество препаратов, разрабатывающихся для системного введения, увеличилось с одного до 7, большинство из которых представляет собой бислойные липосомы, стабилизированные полиэтиленгликолем и содержащие олигонуклеотиды (SNALP) [2].

Препараты антисенс-олигонуклеотидов для коррекции нарушений липидного обмена

Антисенс-терапия для воздействия на процессы метаболизма липидов направлена на гены, кодирующие апобелки, ферменты липидного обмена и белки-транспортёры липидов, а также miРНК, участвующие в процессах регуляции липидного обмена [35]. В большинстве своем – это АСО второго поколения, направленные на блокировку синтеза белков клеток печени, участвующих в развитии дислипидемий различного типа. В настоящее время несколько препаратов вышли на стадии клинических испытаний.

Антисенс-олигонуклеотиды, воздействующие на уровень липопротеидов высокой плотности

Согласно современным рекомендациям пониженный уровень ХС ЛПВП признан фактором риска развития ИБС. Были проведены несколько исследований эффективности целевого воздействия АСО на гены, которые модулируют концентрацию этой антиатерогенной частицы. МикроРНК miR33 играет важную роль в мета-

болизме ЛПВП как посттранскрипционный регулятор генов, вовлеченных в синтез холестерина, захвата, транспорта, а также метаболизма жирных кислот [36]. Было показано, что miR33 подавляет уровень экспрессии гена АТФ-зависимого трансмембранного транспортера (ABCA1) электронейтральных частиц, а также транспорт холестерина апоАI. Введение двух АСО для подавления miR33 мышам с различным потреблением жирной пищи и мышам с дефицитом ЛПНП-рецепторов приводило к увеличению как уровней ABCA1, так и ХС ЛПВП, а также к увеличению обратного транспорта холестерина и сокращению размеров атеросклеротической бляшки [36].

СЕТР, играющий важную роль в обратном транспорте холестерина, также является перспективной мишенью для воздействия на уровень ХС ЛПВП. Дефицит СЕТР связан с увеличением уровня ХС ЛПВП и уменьшением ХС ЛПНП, а также со снижением риска ИБС. Несмотря на противоречивое отношение к СЕТР как терапевтической мишени, низкомолекулярные ингибиторы данного фермента находятся на стадии клинических испытаний [37]. Более 10 лет назад в опытах *in vivo* была показана эффективность использования АСО первого поколения, блокирующих синтез СЕТР, для модуляции уровня ХС ЛПВП и регрессии атеросклеротических поражений у кроликов. Сейчас исследуются АСО второго поколения в опытах *in vivo* на СЕТР трансгенных мышах в сравнении с низкомолекулярным ингибитором фермента «anacetrapib» [3].

Антисенс-олигонуклеотиды для снижения уровня триглицеридов

Антисенс-технологии открыли широкую перспективу для попытки воздействия на концентрацию ТГ с использованием в качестве мишеней генов многочисленных белков, вовлеченных в их метаболизм [3]. Одной из наиболее очевидных мишеней для воздействия на уровень ТГ является апоСIII, из-за связи данного апобелка с развитием триглицеридемии, атеросклероза, ССЗ и других метаболических нарушений [14, 38]. Генетические исследования свидетельствуют о положительном влиянии пониженного уровня апоСIII на уровень ТГ и атерогенных липопротеидов, а также на продолжительность жизни [39].

Доклинические данные, полученные в животных моделях, свидетельствуют о том, что блокирование синтеза апоСIII с использованием системно введенного препарата АСО второго поколения безопасно, и может с высокой эффективностью (более 80%) снижать концентрацию ТГ [3]. Дальнейшее изучение такого препарата на различных моделях трансгенных крыс и мышей подтвердило значимое снижение уровней апоСIII, ТГ и общего холестерина (ОХС), увеличение концентрации ХС ЛПВП, сопровождавшихся регрессией ате-

росклеротических поражений аорты. Кроме того, подавление синтеза апоСIII у трангенных крыс приводило к улучшению чувствительности к инсулину, что соответствует наблюдениям в нескольких популяциях с мутацией в гене апоСIII. Также препарат обладал способностью снижать жировую дистрофию печени [3, 39]. Терапевтический препарат на основе АСО, блокирующий синтез апоСIII, разрабатываемый фирмой «Isis Pharmaceuticals Inc», находится на стадии клинических испытаний по оценке безопасности и переносимости у человека.

Ацил-кофермент А – диацилглицерол ацилтрансфераза (DGAT) – другой ключевой фермент, участвующий в синтезе ТГ. Его ген также может быть использован как таргетная молекула для коррекции триглицеридемии. Введение DGAT2 АСО трансгенным мышам, страдающим ожирением, приводило к заметному снижению содержания ТГ и жировому гепатозу печени. Кроме этого, было отмечено снижение скорости секреции печеночных ТГ, концентрации ТГ, ОХС и апоВ в плазме на фоне положительных изменений профиля липопротеинов плазмы. Интересно, что положительный эффект от применения АСО к DGAT2 сопровождался снижением уровня мРНК нескольких печеночных липогенных генов, в том числе ФАС, ACC1, ACC2, АТФ-цитратлиазы, глицерин киназы и ГМГ-КоА-редуктазы [40]. Дальнейшая разработка терапии на основе АСО против DGAT2 позволит замедлить процессы липогенеза и жировой дистрофии печени на фоне нормализации липидного профиля и снижения гиперлипидемии. Такие препараты могут быть востребованы для лечения больных с ожирением и/или метаболическим синдромом [41].

Антисенс-олигонуклеотиды для снижения липопротеидов низкой плотности

Повышенный уровень ХС ЛПНП – это ключевой фактор риска атеросклероза, что подтверждается при гомозиготной наследственной гиперхолестеринемии. Многолетнее использование статинов как гиполипидемических препаратов первого ряда показало эффективность и безопасность снижения ХС ЛПНП.

Подход с использованием РНК интерференции для снижения апоВ100 был описан в ряде исследований и

использован несколькими фармацевтическими компаниями. Возможность эффективного влияния антисенс-препаратов на основе siРНК на синтез апоВ была показана на трансгенных мышах и обезьянах при кратковременном системном введении [42]. Достоверное снижение концентрации апоВ, ОХС и ХС ЛПНП наблюдалось уже через 24 ч после введения и длилось в течение 11 дней на максимальной дозе препарата, однако в работе отсутствуют данные, опровергающие накопление нейтральных липидов в печени [42]. Однако при проведении первой фазы клинических испытаний на пациентах с гиперхолестеринемией испытания были приостановлены в 2010 г. из-за развившихся побочных эффектов на максимальной дозе препарата у двух пациентов и недостаточной эффективности препарата [43].

Использование в качестве вектора для доставки α -токоферола (Тос), ковалентно связанного с 5' концом 27/29-членного siРНК к апоВ, приводило к 80% снижению эндогенного апоВ РНК (мРНК) в печени. После введения 2 мг/кг Тос-siРНК препарата не было отмечено достоверных изменений в лейкоцитарной формуле, количестве тромбоцитов, в концентрациях общего белка, аминотрансминаз и других компонентов биохимического анализа крови. Также не было выявлено патологических отклонений при анализе ткани печени после окраски гематоксилином/эозином. Несмотря на то, что эффективность таких препаратов уступала вышеописанному, данный подход может являться перспективным для создания эффективных и безопасных препаратов для антисенс-терапии [44].

Недавно были представлены данные о разработке более коротких LNA-модифицированных АСО, специфичных к гену апоВ100. 13-членный препарат в опытах *in vitro* и *in vivo* на мышах и высших приматах демонстрировал преимущество в специфичности и эффективности снижения уровня апоВ, не-ЛПВП холестерина в дозах 1-2 мг/кг веса, а также одинаковую биодоступность и время полужизни по сравнению с более длинными (свыше 14) олигонуклеотидами, описанными ранее. Кроме того, такие препараты практически не обладали токсичностью и достоверно не изменяли уровень АЛТ в сыворотке [45]. Следовательно, LNA-модифицированные высокоспецифичные короткие оли-

Таблица 1. Данные об эффективности препарата мипомерсен при проведении III фазы клинических испытаний

Популяция пациентов (n)	Исходный уровень ХС ЛПНП (мг/дл)	Δ ХС ЛПНП, % (мг/дл)	Δ апоВ, % (мг/дл)	Δ Лп(а), % (мг/дл)
Гомозиготная семейная ГХС (n=51)	439	-25 (-106)	-27 (-77,7)	-31 (-20,5)
Тяжелая ГХС (58)	276	-36 (-101,2)	-36 (-75,3)	-33 (-18)
Гетерозиготная семейная ГХС (n=124)	153	-28 (-46)	-26 (-37,8)	-21 (-14,4)
Повышенный уровень ОХС у больных с высоким риском ССЗ (n=158)	123	-37 (-47,3)	-38 (-44,3)	-24 (-14,7)
ГХС – гиперхолестеринемия; ОХС – общий холестерин; ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания				

гонуклеотиды обладают хорошим потенциалом для создания нового поколения лекарственных препаратов.

Лидирующим и одобренным FDA является препарат АСО второго поколения – 20-звенный 2'МОЕ химерный олигонуклеотид – мипомерсен (ISIS 301012), блокирующий синтез апоВ100 (Isis Pharmaceuticals Inc.; табл. 1). АСО ориентирован против участка мРНК апоВ человека, находящегося в положении 3249-3269 22 экзона. В экспериментах на животных различных видов, включая приматов, было показано, что использование данного препарата ингибировало апоВ на уровне экспрессии мРНК в печени, а также снижало концентрацию апоВ100, ХС ЛПНП и ОХС [41]. В рамках III фазы клинических испытаний препарата было проведено 4 рандомизированных двойных слепых плацебо-контролируемых многоцентровых исследования влияния 200 мг мипомерсена, вводимого еженедельно в течение 26 нед совместно с другими липид-снижающими препаратами пациентам с гомозиготной формой семейной гиперхолестеринемии (ГХС), гетерозиготной ГХС, пациентам с ГХС и высоким сердечно-сосудистым риском и пациентам с тяжелой гетерозиготной ГХС на фоне максимально переносимых доз липид-снижающих препаратов [41]. Применение мипомерсена снижало уровень апоВ на 27%, ХС ЛПНП на 25%, Лп(а) на 31% и ТГ на 17%. Также было отмечено увеличение концентрации ХС ЛПВП. Эффективность снижения концентрации ХС ЛПНП колебалась в широких пределах и не зависела от исходного уровня, пола, этнической принадлежности и возраста (табл. 1) [3].

На сегодняшний день препарат планируется как дополнительное терапевтическое средство для лечения пациентов с высоким риском развития ИБС и уровнем ХС ЛПНП, превышающим целевой, на максимально переносимой липид-снижающей терапии. Необходимо отметить, что препарат не был рекомендован для применения Европейскими регуляторными органами, о чем будет сказано ниже.

Описан также альтернативный подход, основанный на подавлении секреции апоВ100 с помощью 2'-ОМЕ модифицированных АСО, нацеленных на 5' и 3' участки сплайсинга 27 экзона, в результате чего гепатоцитами синтезируется укороченный вариант апоВ (апоВ-87). По мнению разработчиков, синтез апоВ-87 должен привести к снижению уровня ХС ЛПНП и ОХС в плазме крови, по аналогии с тем, что наблюдается у пациентов с гипобетапопротеидемией. В отличие от других препаратов АСО, такой подход не должен подавлять экспрессию апоВ48, что позволит создать поколение более «мягких» препаратов для лечения гиперлипидемии [46].

Другой мишенью для воздействия на уровень ХС ЛПНП может служить препротеза PCSK9 из семейства препротезин конвертаз. PCSK9 синтезируется в

печени, почках и тонком кишечнике и играет важную роль в липидном обмене за счет регуляции деградации ЛПНП-рецептора в печени. Мутации, связанные с потерей функции PCSK9, приводят к снижению ХС ЛПНП и уменьшению риска заболеваемости ИБС [47]. Чрезвычайно низкий (не выше 20 мг/дл) уровень ХС ЛПНП у лиц практически без PCSK9 при неимении других клинических проявлений, отсутствие известных на сегодняшний день других функций PCSK9, кроме деградации ЛПНП-рецептора, а также высокий уровень экспрессии данного белка в печени делают PCSK9 практически идеальной мишенью для разработки лекарственных препаратов для снижения ХС-ЛПНП при помощи антисенс-технологий [3, 41, 43].

Введение препарата АСО второго поколения против PCSK9 2 р/нед мышам, находящимся на жирной диете, приводило к снижению ОХС на 53% и ХС ЛПНП на 38% за полтора мес наблюдения [48]. Кроме того, 92% ингибирование синтеза PCSK9 приводило к двукратному увеличению содержания ЛПНП-рецептора в печени. Еще более обнадеживающие результаты были получены при внутривенном введении мышам более коротких АСО третьего поколения, содержащих LNA-модификацию. Введение такого препарата *in vivo* приводило к 60% снижению уровня мРНК PCSK9, при этом продолжительность действия составляла 16 дней. Уровень ЛПНП-рецептора в печени повышался в 2,5-3 раза и оставался таким в течение 8 дней [49].

Подобные результаты были получены и при исследовании 14-звенного LNA-модифицированного олигонуклеотида против PCSK9 приматов и человека. После введения однократной дозы 20 мг/кг и четырехкратного еженедельного введения поддерживающей дозы 5 мг/кг уровень мРНК в печени и концентрация белка PCSK9 в сыворотке были снижены на 85%. Полученный эффект двукратного снижения уровня ХС ЛПНП и отсутствие достоверного уменьшения уровня ХС ЛПВП на фоне хорошей переносимости препарата, отсутствия токсичности и изменений в уровнях АСТ и АЛТ делает такие препараты перспективными для дальнейшей разработки лекарственных средств для лечения статин-резистентных больных [50]. В настоящее время такой препарат находится на предклинической стадии разработки в компании Santaris Pharma A/S (США), несмотря на то, что ранее сообщалось, что исследования аналогичного препарата были прекращены на I фазе испытаний в октябре 2011 г [41]. Также I фаза клинических испытаний антисмысловых ингибиторов PCSK9 была прекращена Bristol Myers Squibb (США) в 2010 г.

АСО для снижения концентрации Лп(а)

Повышенный уровень Лп(а) является фактором риска возникновения и развития атеросклероза различных локализаций, ИБС и острых коронарных со-

бытий. При этом концентрация Лп(а) устойчива к существующим медикаментозным препаратам [6].

Описанный выше препарат АСО, блокирующий синтез апоВ100 – мипомерсен – способен также снижать концентрацию Лп(а) на 30% [4, 51].

Возможность снижения концентрации апо(а) с использованием специфических АСО у трансгенных мышей, экспрессирующих апо(а) различной молекулярной массы появилась в 2011 г [51, 52]. После введения препарата АСО, направленного на участок мРНК, кодирующий участок IV крингла 2-го типа, в дозе 50 мг/кг/нед в течение 6 нед, уровни Лп(а) и апо(а) были снижены на 25 и 19% соответственно. Максимальная эффективность снижения апо(а) на 86% наблюдалась в модели трансгенных животных, экспрессирующих апо(а) с большей молекулярной массой.

Безопасность и переносимость терапевтических препаратов антисенс-олигонуклеотидов

Самый большой массив данных о безопасности и переносимости препаратов на основе АСО накоплен фирмой «ISIS Pharmaceuticals Inc.». Единообразие структуры гапмеров с использованием 2'-МОЕ модификации АСО, обеспечивающей повышенную безопасность по сравнению с другими классами химически-модифицированных АСО, а также ясность и универсальность механизма действия через РНКазу H позволяет, по мнению разработчиков, рассчитывать на подобный профиль безопасности для всей линейки препаратов, вне зависимости от последовательности олигонуклеотидов. Этот вывод основан на данных по использованию 8 препаратов первого поколения для лечения 3800 пациентов, 20 препаратов второго поколения для лечения 2200 пациентов в 79 клинических исследованиях в 12 популяциях здоровых и больных ревматоидным артритом, диабетом, гиперхолестеринемией, онкологическими заболеваниями и др.

Среднее 2-3-кратное увеличение концентрации печеночных ферментов за счет провоспалительного эффекта и инфильтрации иммунных клеток в печень (отмеченное на мышах) не было подтверждено при проведении доклинических исследований на обезьянах и I-II фаз клинических испытаний. Однако в исследованиях III фазы препарата мипомерсен у 8% пациентов было отмечено последовательное, вплоть до 3-кратного, увеличение концентрации АЛТ [53]. Уровень АЛТ возвращался к нормальному после прекращения лечения, что было, по-видимому, связано с быстрым и резким сокращением концентрации апоВ и ХС ЛПНП [41, 53]. Другой потенциальной причиной повышения уровня АЛТ может являться жировая дистрофия печени за счет ингибирования секреции липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП). Умеренное жировое перерождение печени у одного из десяти больных (об-

наруженное при измерении внутрипеченочного уровня ТГ с помощью протонной магнитно-резонансной спектроскопии) в 3-х недельном исследовании мипомерсена прошло без какого-либо вмешательства после прекращения лечения [54].

Наиболее частыми общими побочными эффектами, наблюдаемыми у пациентов после введения АСО препаратов, были кожная реакция в месте введения препарата (ISRs симптом) и гриппо-подобные симптомы. ISRs-симптом является не только общим для всех АСО препаратов второго поколения [55], но и часто наблюдается при подкожном введении других лекарственных средств. ISRs-симптомы, наблюдаемые в исследованиях препарата мипомерсен, как правило, зависели от дозы введенного препарата и проявлялись в виде эритемы от легкой до умеренной степени, возникающей в течение 24 час после введения препарата. Используемые при подкожном введении других препаратов методы купирования ISRs-симптома, в том числе совместное введение мипомерсена с кортикостероидами, использование нескольких точек инъекции и альтернативные режимы дозирования способны снизить частоту и тяжесть кожных реакций [3].

Несмотря на одобрение препарата в США, Европейское Агентство по лекарственным средствам отказало в регистрации препарату мипомерсен (торговая марка KYNAMRO™ «ISIS Pharmaceuticals Inc» и «Sanofi's Genzyme») для лечения больных ГХС из-за неблагоприятного профиля безопасности. Значительная часть пациентов прекратили прием лекарства в течение двух лет, в основном, из-за побочных эффектов, таких как гриппоподобные симптомы, кожные реакции и гепатотоксичности, причем, среди пациентов были больные с тяжелой ГХС, практически не имеющие альтернативных вариантов лечения. Наличие побочных реакций, а также жировая дистрофия печени и повышение уровня ферментов у пациентов, принимавших KYNAMRO™, вызвало обеспокоенность, поскольку препарат предназначен для длительного лечения в целях поддержания оптимального уровня холестерина. По мнению Европейских экспертов, компания не обеспечила достаточных мер, чтобы предотвратить риск необратимого повреждения печени. Увеличение частоты серьезных сердечно-сосудистых событий в группе пациентов, принимающих мипомерсен, относительно группы плацебо, привели ЕМА к заключению, что возможная польза не превышает риски применения препарата.

Для siРНК, используемых в качестве терапевтических препаратов, данных о возможных побочных явлениях практически не существует, поскольку такие препараты только разрабатываются. Существует потенциальная опасность возможной конкуренции АСО, влияющих на целевую РНК по механизму РНК-интерференции, с эндогенными miРНК при образовании комплекса RISC

[56,57]. Несмотря на высокую специфичность siРНК для ингибирования экспрессии продукта конкретного гена, было описано подавление экспрессии генов, отличных от гена-мишени – так называемый «off-target» эффект [30], который может привести к нежелательным последствиям и потенциальной трансформации клеток. «Off-target» эффект является результатом гомологии шести или семи нуклеотидов в «seedregion» siРНК, подобно miРНК, проявляющих свою активность при частичной комплементарности последовательности в 6-8 олигонуклеотидов с 3' концом целевого участка (фрагмента) мРНК [58]. Кроме того, комплементарность с некоторыми miРНК в «seedregion» могут привести к измененной экспрессии семейства генов, регулируемых этими эндогенными miРНК [30].

Другой возможной проблемой может являться активация иммунного ответа siРНК, поскольку было показано, что 23-звенные дуплексы siРНК могут активировать выброс интерферона и вызвать гибель клеток в культуре [59]. Некоторые siРНК могут связываться и активировать Toll-подобный рецептор 7 (TLR7), обеспечивающий функционирование врождённого иммунитета и локализованный в эндосомах. При этом Toll-подобный рецептор 7 способен распознавать только siРНК, содержащие открытую 5'-GUCCUCAA-3' или подобную гуанидин-уридин последовательность [60].

Заключение

В последние несколько лет антисенс-олигонуклеотиды из исследовательского инструмента превратились в перспективное направление для создания нового поколения терапевтических препаратов. В настоящее время несколько крупных фармацевтических компаний, таких как Medtronic, Novartis, Merck, Pfizer и др. активно участвуют в разработке лекарственных препаратов на основе антисенс-олигонуклеотидов для лечения онкологических, сердечно-сосудистых, вирусных и других заболеваний. Для создания таких препаратов наиболее часто используют олигонуклеотиды, действующие через набор эндо-

генных клеточных путей деградации, включая механизмы РНК интерференции.

Результаты новейших разработок в области химической модификации олигонуклеотидов, создание безопасных вирусных и невирусных носителей позволило во многом решить вопрос стабилизации и системной доставки АСО, что привело к достоверному росту числа антисенс-препаратов, которые в ближайшее время могут выйти на фармацевтический рынок.

На разных стадиях разработки и клинических исследований находятся препараты АСО против апоВ100, апо(а) и PCSK9, корректирующие нарушения липидного обмена и влияющие на уровень ХС-ЛПНП и Лп(а); препараты против апоСIII, DGAT, ACC1 и ACC2, снижающие концентрацию ТГ, и олигонуклеотиды, воздействующие на уровень ХС ЛПВП посредством регуляции микро РНК miR33 и CETP. На сегодняшний день единственным одобренным FDA препаратом для основе АСО для коррекции уровня ХС ЛПНП и Лп(а) является препарат мипомерсен (зарегистрированный как KYNAMRO™ (ISIS Pharmaceuticals Inc и Sanofi's Genzyme), способный блокировать синтез апоВ100. Несмотря на разрешение FDA, препарат не был зарегистрирован в Европе из-за неблагоприятного профиля безопасности.

Препараты на основе siRNA пока не продвинулись далее начальных фаз клинических испытаний, но, несмотря на сложность оценки специфичности и отдаленной безопасности таких препаратов, в будущем они могут оказаться лидирующими относительно других классов АСО за счет природного механизма воздействия.

Несмотря на перспективы, открывающиеся для разработки новых препаратов на основе антисенс-технологий, остается еще множество вопросов, связанных с их эффективностью и безопасностью, что особенно актуально для гипополипидемических препаратов, рассчитанных на долгосрочное применение.

Конфликт интересов. Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература

- Bennet CF, Swayze EE. RNA Targeting Therapeutics: Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; 50: 259-93.
- Haussechneider D. The Business of RNAi Therapeutic in 2012. *Molecular Therapy*. *Nucleic Acids* 2012; 2: e8.
- Crooke RM, Graham MJ. Therapeutic potential of antisense oligonucleotides for the management of dyslipidemia. *Clin Lipidol* 2011; 6(6): 675-92.
- Raal FJ, Santos RD. Homozygous familial hypercholesterolemia: current perspectives on diagnosis and treatment. *Atherosclerosis* 2012; 223(2): 262-8.
- Fruchart JC, Sacks FM, Hermans MP, et al. The Residual Risk Reduction Initiative: a call to action to reduce residual vascular risk in dyslipidaemic patient. *Diabetes Vasc Dis Res* 2008; 5: 319-35.
- Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, et al. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J* 2010; 31: 2844-53.
- Yezhov MV, Trukhacheva EP, Afanasieva OI, et al. Relationship of lipoprotein (a) and homocysteine with coronary atherosclerosis in young and middle ages. *Cardiovascular Therapy and Prevention* 2008; (5): 10-15. Russian (Ежов М.В., Трухачева Е.П., Афанасьева О.И., и др. Связь липопротеида(а) и гомоцистеина с коронарным атеросклерозом у мужчин молодого и среднего возрастов. Кардиоваскулярная Терапия и Профилактика 2008; (5): 10-15).
- Afanasyeva OI, Yezhov CF, Afanasyeva MI, et al. Relationship low molecular phenotype of apoprotein (a) and concentrations of lipoprotein (a) with multifocal atherosclerosis in patients with coronary heart disease. *Rational Pharmacother Card* 2010; 6 (4): 474-80. Russian (Афанасьева ОИ, Ежов МВ, Афанасьева МИ, и др. Связь низкомолекулярного фенотипа апоБелка(а) и концентрации липопротеида(а) с мультифокальным атеросклерозом у больных ишемической болезнью сердца. Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии 2010; 6 (4): 474-80).
- Safarova MS, Yezhov MV, Trukhacheva EP et al. Pleiotropic effects of nicotinic acid in men with coronary heart disease and high lipoprotein (a). *Cardiology* 2011; (5): 9-16. Russian (Сафарова МС, Ежов М.В., Трухачева Е.П. и др. Плеiotропные эффекты никотиновой кислоты у мужчин с ишемической болезнью сердца и высоким уровнем липопротеида(а). Кардиология 2011; (5): 9-16).
- Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 2010; 466(7307): 707-13.
- Bauer RC, Stylianou IM, Rader DJ. Functional validation of new pathways in lipoprotein metabolism identified by human genetics. *Curr Opin Lipidol* 2011; 22(2): 123-8.
- Chapman MJ, Ginsberg HN, Amarencu P et al. Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *Eur Heart J* 2011; 32 (11): 1345-61.
- Danesh J, Erqou S, Walker M et al. The Emerging Risk Factors Collaboration: analysis of individual data on lipid, inflammatory and other markers in over 1.1 million participants in 104 prospective studies of cardiovascular diseases. *Eur J Epidemiol* 2007; 22 (12): 839-69.
- Ooi EMM, Barrett HR, Chan DC, et al. Apolipoprotein CIII: understanding an emerging risk factor. *Clin Sci* 2008; 114: 611-624.
- Chapman MJ, Le Goff W, Guerin M, et al. Cholesteryl ester transfer protein: at the heart of the action of lipidmodulating therapy with statins, fibrates, niacin, and cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *Eur Heart J* 2010; 31 (2): 149-64.
- Brautbar A, Ballantyne CM. Pharmacological strategies for lowering LDL cholesterol: statins and beyond. *Nat Rev Cardiol* 2011; 8(5): 253-9.
- Wu H, Lima WF, Zhang H, et al. Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs. *J Biol Chem* 2004; 279: 17181-9.
- Makarov YuA, Kramerov DA. The non-coding RNA. *Browse. Biochemistry* 2007; 72 (11): 1427-48. Russian (Макарова ЮА, Крамеров ДА. Некодирующие РНК. Обзор. Биохимия 2007; 72(11): 1427-48).
- Liu J, Carnell MA, Rivas FV, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004; 305: 1437-41.
- Shrivastava N, Shrivastava A. RNA interference: an emerging generation of biologicals. *Biotechnol J* 2008; 3(3): 339-3.
- Hartmann D, Thum T. Micro RNAs and vascular (dis)function. *Vascular Pharmacology* 2011; 102: 5592-605.
- Bratkovič T, Glavan G, Strukelj B, Zivin M, Rogelj B. Exploiting microRNAs for cell engineering and therapy. *Biotechnol Adv* 2012; 30(3): 753-65.
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136: 215-336.
- Bill BR, Petzold AM, Clark KJ, et al. A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish* 2009; 6: 69-77.
- Hochreiter AE, Xiao H, Goldblatt EM, et al. Telomerase template antagonist GRN163L disrupts telomere maintenance, tumor growth, and metastasis of breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3184-92.
- Skoblov MYU. Prospects for antisense therapy technologies. *Molecular Biology* 2009; 43 (6): 984-998. Russian (Скоблов М.Ю. Перспективы технологий антисмысловой терапии. Молекулярная Биология 2009; 43(6): 984-998).
- Daka A, Peer D. RNAi-based nanomedicines for targeted personalized therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64(13): 1508-21.
- Mysara M, Garibaldi J, Elhefnawi M. Mys iRNA – designer: a workflow for efficient siRNA design. *PLoS One* 2011; 6: e25642.
- Mook OR, Baas F, de Wissel MB, Fluiters K. Evaluation of locked nucleic acid-modified small interfering RNA in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(3): 833-43.
- Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(2-3): 75-86.
- Gao YS, Mei J, Tong TL, et al. Inhibitory effects of VEGF-siRNA mediated by adenovirus on osteosarcoma-bearing nude mice. *Cancer Biother Radiopharm* 2009; 24(2): 243-7.
- Raghuathan S, Patel BM. Therapeutic implications of interfering RNA in cardiovascular diseases. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 2013; 27(1): 1-20.
- Gao Y, Liu XL, Li XR. Research progress on siRNA delivery with nonviral carriers. *Int J Nanomedicine* 2011; 6: 1017-25.
- Gavrilov K, Saltzman MW. Therapeutic siRNA: Principles, Challenges, and Strategies. *Yale Journal of Boil And Med* 2012; 85: 187-200.
- Rayner KJ, Fernandez-Hernando C, Moore KJ. MicroRNAs regulating lipid metabolism in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2012; 107(4): 642-7.
- Rayner K, Suarez Y, Davalos A et al. miR33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science* 2010; 328: 1570-3.
- Miyares MA. Anacetrapib and dalcetrapib: two novel cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *Ann Pharmacother* 2011; 45: 84-94.
- Olivieri O, Martinielli N, Girelli G et al. Apolipoprotein CIII predicts cardiovascular mortality in severe coronary artery disease and is associated with an enhanced thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 463-71.
- Holmberg R, Refai E, Hoog A et al. Lowering apolipoprotein CIII delays onset of type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(26): 10685-9.
- Liu Y, Millar JS, Cromley DA, et al. Knockdown of Acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 2 with antisense oligonucleotide reduces VLDL TG and ApoB secretion in mice. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1781: 97-104.
- Visser ME. Antisense oligonucleotide for the treatment of dyslipidaemia. *Eur Heart J* 2012; 33: 1451-8.
- Zimmermann TS, Lee ACH, Akinc A, et al. RNAi-mediated gene silencing in nonhuman primates. *Nature* 2006; 441: 111-4.
- Kassim SH, Wilson JM, Rader DJ. Gene therapy for dyslipidemia: a review of gene replacement and gene inhibition strategies. *Clin Lipidol* 2010; 5(6): 793-809.
- Nishina K, Unno T, Uno Y et al. Efficient in vivo delivery of siRNA to the liver by conjugation of alpha-tocopherol. *Mol Ther* 2008; 16: 734-40.
- Straarup EM, Fisker N, Hedtja M, et al. Short locked nucleic acid antisense oligonucleotides potently reduce apolipoprotein B mRNA and serum cholesterol in mice and non-human primates. *Nucleic Acids Research* 2010; 38(20): 7100-11.
- Khoo B, Roca X, Chew SL, et al. Antisense oligonucleotide-induced alternative splicing of the APOB mRNA generates a novel isoform of APOB. *BMC Mol Biol* 2007; 8: 3-16.
- Zhang DW, Lagace TA, Garuti R et al. Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem* 2007; 282: 18602-12.
- Graham MJ, Lemonidis KM, Whipple CP et al. Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. *J Lipid Res* 2007; 48: 763-7.
- Gupta N, Fisker N, Asselin MC et al. A locked nucleic acid antisense oligonucleotide (LNA) silences PCSK9 and enhances LDLR expression in vitro and in vivo. *PLoS One* 2010; 5(5): E10682.
- Lindholm MW, Elmén J, Fisker N, et al. PCSK9 LNA antisense oligonucleotides induce sustained reduction of LDL cholesterol in nonhuman primates. *Mol Ther* 2012; 20(2): 376-81.
- Merki E, Graham MJ, Mullick AE, et al. Antisense oligonucleotide directed to human apolipoprotein B-100 reduces lipoprotein(a) levels and oxidized phospholipids on human apolipoprotein B-100 particles in lipoprotein(a) transgenic mice. *Circulation* 2008; 118: 743-53.
- Merki E, Graham MJ. Antisense oligonucleotide lowers plasma levels of apolipoprotein(a) and lipoprotein(a) in transgenic mice. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57(15): 1611-21.
- Raal FJ, Santos RD, Blom DJ et al. Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2010; 375: 998-1006.
- Visser ME, Kastelein JJ, Stroes ES. Apolipoprotein B synthesis inhibition: results from clinical trials. *Curr Opin Lipidol* 2010; 21(4): 319-23.
- Kwoh TJ. An overview of the clinical safety experience of first and second generation antisense oligonucleotides. In: Crooke ST, editor. *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies and Application* (2nd Edition). Boca Raton, FL: CRC press; 2008: 365-99.
- Vickers TA, Lima WF, Nichols JG, et al. Reduced levels of Ago2 expression result in increased siRNA competition in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 6598-610.
- John M, Constien R, Akinc A, et al. Effective RNAi-mediated gene silencing without interruption of the endogenous microRNA pathway. *Nature* 2007; 449: 745-47.
- Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A et al. 3'UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods* 2006; 3(3): 199-204.
- Reynolds A, Anderson EM, Vermeulen A, et al. Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length- dependent. *RNA* 2006; 12(6): 988-93.
- Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, et al. Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005; 11(3): 263-70.

Поступила: 30.09.2013

Принята в печать: 01.10.2013