

АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА — КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ПОКОЛЕНИЙ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЛИПИДСНИЖАЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ

Афанасьева О. И., Езов М. В., Покровский С. Н.

Разработка инновационных биотехнологических препаратов на основе гуманизированных или полностью человеческих моноклональных антител или антисмысловых олигонуклеотидов открыло новую эру в лечении нарушений липидного обмена. Высокая эффективность таких биологических лекарств, воздействующих на ключевые звенья липидного обмена: апобелок В100, апобелок(а), апобелок СIII, пропротеин-конвертаза субтилизин-кексинового типа 9, антипоэтин-подобный белок 3, открывает перспективу коррекции тяжелых или статин-резистентных форм дислипидемий, с возможностью достичь практически полной ремиссии заболевания. Однако, доказательство безопасности препаратов антисмысловых олигонуклеотидов, требует дополнительных обширных и продолжительных клинических исследований. Такие лекарства могут применяться у пациентов с орфанными заболеваниями или тяжелыми нарушениями липидного обмена, не имеющими альтернативного лечения. Напротив, препараты на основе человеческих моноклональных антител благодаря доказанной в рамках обширных программ клинических исследований безопасности начинают активно использоваться.

Внедрение новых поколений биологических препаратов в клиническую практику, дает врачам дополнительные возможности снижения сердечно-сосудистого риска у больных с тяжелыми и сложными нарушениями липидного обмена.

Российский кардиологический журнал. 2018;23(8):99–109

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-8-99-109>

Ключевые слова: антисмысловые олигонуклеотиды, терапевтические антитела, гиперлипидемия, сердечно-сосудистые заболевания, гиполлипидемическая терапия.

Конфликт интересов: не заявлен.

ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, Москва, Россия.

Афанасьева О. И.* — д.б.н., в.н.с. лаборатории проблем атеросклероза института экспериментальной кардиологии, ORCID: 0000-0001-8909-8662, Езов М. В. — д.м.н., в.н.с. отдела атеросклероза института клинической кардиологии, ORCID: 0000-0002-1518-6552, Покровский С. Н. — профессор, д.б.н., и.о. руководителя лаборатории проблем атеросклероза института экспериментальной кардиологии, ORCID: 0000-0001-5944-6427.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

afanasieva.cardio@yandex.ru

2'MOE — химерная конструкция содержащая 2'-О-метоксиэтил/тиофосфатную модификацию олигонуклеотидов, ANGPTL3 — ангиопоэтин-подобный белок, LNA — модификация — Locked Nucleic Acids ковалентно замкнутые нуклеиновые кислоты, PCSK9 — пропротеин-конвертаза субтилизин-кексинового типа 9, RISC — RNA Induced Silencing Complex — РНКазы подобная эндонуклеаза, состоящая из нескольких субъединиц, расщепляющая двуцепочечную РНК в ядре клетки, апоВ100 — апобелок В100, апоСIII — апобелок СIII, АСО — антисмысловые олигонуклеотиды, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИМ — инфаркт миокарда, КИ — клинические исследования, кРНК — короткие интерферирующие РНК, Лп(а) — липопротеид(а), МкАт — моноклональные антитела, мРНК — матричная (информационная) РНК, ОР — относительный риск, РНКазы — эндонуклеаза (РНКазы), расщепляющая двуцепочечную РНК в ядре клетки, СГХС — семейная гиперхолестеринемия, СД — сахарный диабет, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания, ССО — сердечно-сосудистые осложнения, ТГ — триглицериды, ХС-ЛВП — холестерин липопротеидов высокой плотности, ХС-ЛНП — холестерин липопротеидов низкой плотности, ХС-ЛОНП — холестерин липопротеидов очень низкой плотности.

Рукопись получена 29.06.2018

Рецензия получена 04.07.2018

Принята к публикации 11.07.2018

ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES AND THERAPEUTICAL MONOCLONAL ANTIBODIES AS A BASEMENT FOR NOVEL BIOLOGICAL LIPID LOWERING DRUGS

Afanasieva O. I., Ezhov M. V., Pokrovsky S. N.

Development of innovational biotechnological medications based on humanized or completely human monoclonal antibodies or antisense oligonucleotides has opened a novel epoch in lipid disorders treatment. High efficacy of such biological drugs influencing the main chains of lipid metabolism (apoprotein B100, apoprotein (a), apoprotein CIII, proprotein-converterase subtilisin-kexin type 9, antipoetin like protein 3) does open a perspective for correction of severe and statin-resistant forms of dyslipidemias, with a possibility to achieve almost complete remission of the disease. However, the evidence of safety of antisense oligonucleotides drugs demands for broader investigation. Such drugs might be used in patients with orphan diseases or serious lipid disorders, not having alternative treatment. Vice versa, the drugs based on the human monoclonal antibodies thank to evidence are started to be in clinical use at the moment.

Несмотря на успехи кардиологии, использование агрессивной гиполлипидемической терапии современными поколениями статинов, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются ведущей причиной

Russ J Cardiol. 2018;23(8):99–109

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-8-99-109>

Key words: antisense oligonucleotides, therapeutic antibodies, hyperlipidemia, cardiovascular diseases, hypolipidemic therapy.

Conflicts of Interest: nothing to declare.

National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russia.

Afanasieva O. I. ORCID: 0000-0001-8909-8662, Ezhov M. V. ORCID: 0000-0002-1518-6552, Pokrovsky S. N. ORCID: 0000-0001-5944-6427.

смерти во всем мире. Разработка инновационных биотехнологических препаратов на основе гуманизированных или полностью человеческих моноклональных антител и антисенс-терапии открыло новую

эру в лечении атеросклероза и нарушений липидного обмена. Использование биотехнологических подходов сделало возможным создание новых, эффективных и безопасных препаратов для коррекции тяжелых или статин-резистентных форм дислипидемий, открывающих перспективы практически полной ремиссии заболевания.

Препараты на основе антисмысловых олигонуклеотидов (АСО)

Изначально центральная догма молекулярной биологии была сформулирована как “ДНК-РНК-белок”. Такая последовательность передачи информации позволяет воздействовать на биосинтез белковых продуктов путем воздействия и изменения структуры информационной (матричной) РНК (мРНК). Антисенс-терапия — метод лечения, основанный на ингибировании синтеза белка, участвующего в развитии заболевания, путем блокирования трансляции его мРНК с помощью комплементарных к ней коротких нуклеотидных последовательностей. В данном обзоре АСО определяются как олигонуклеотиды длиной от 8 до 50 нуклеотидов, которые целиком или частично связываются с мРНК по принципу комплементарности Ватсона-Крика и препятствуют дальнейшей трансляции мРНК в белок (рис. 1). По количеству цепей и механизму действия такие препараты принято подразделять на два класса — (1) одноцепочечные АСО, действующие через РНКазуN в ядре клетки и (2) двуцепочеч-

ные олигонуклеотидные последовательности коротких интерферирующих РНК (киРНК), действующие по механизму РНК-интерференции через комплекс RISC в цитоплазме.

Несмотря на то, что принципы технологии АСО предложены в конце 60-х годов прошлого века, активное развитие данного направления применительно к созданию новых поколений лекарственных препаратов началось относительно недавно. До клинического применения дошли только несколько препаратов, однако в разработке и на разных стадиях клинических исследований (КИ) находятся более 40 новых лекарственных препаратов на основе АСО.

Липидный обмен человека регулируется многими генами, большинство из которых могут являться потенциальными мишенями для “антисмысловой” терапии [1, 2]. В настоящее время разрабатываются препараты, направленные на гены, кодирующие апо-белки, ферменты липидного обмена и белки-транспортеры липидов, а также микроРНК, участвующие в процессах регуляции липидного обмена [3, 4]. В настоящем обзоре рассматриваются только те препараты, которые успешно прошли все стадии доклинических испытаний и в настоящее время находятся на различных стадиях КИ или разрешены к применению (табл. 1).

АСО для снижения холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС-ЛНП). Фактически единственным препаратом АСО, в настоящее время вышедшим в клиническую практику и одобренным Управлением по надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов является препарат АСО второго поколения — 20-звенный 2’МОЕ химерный олигонуклеотид — мипомерсен (торговое название “Kinamro”, Ionis Pharmaceuticals Inc, США (ранее “Isis Pharmaceuticals Inc”), блокирующий синтез апо-белкаВ100 (апоВ100). Было проведено 4 рандомизированных, двойных слепых, плацебо контролируемых, многоцентровых КИ III фазы влияния 200 мг мипомерсена, вводимого еженедельно в течение 26 нед. совместно с другими липид-снижающими препаратами пациентам с гомозиготной формой семейной гиперхолестеринемии (СГХС), гетерозиготной СГХС, у пациентов с гиперхолестеринемией (ГХС) и высоким сердечно-сосудистым риском и пациентов с тяжелой гетерозиготной ГХС на фоне максимально переносимых доз липид-снижающих препаратов [5, 6]. Применение мипомерсена снижало уровень апо-белкаВ100 (апоВ100) на 27%, ХС-ЛНП на 25%, липопротеида(а) (Лп(а)) на 31% и триглицеридов (ТГ) на 17% [7].

На сегодняшний день препарат используется в качестве вспомогательной терапии для лечения пациентов с гомозиготной формой СГХС. Эффективность мипомерсена в педиатрии (возраст от 12 до 18 лет) для снижения апоВ100 и ХС-ЛНП у паци-



Рис. 1. Принцип действия инновационных биологических лекарственных препаратов на основе терапевтических МкАт и АСО.

Примечание: адаптировано из [56].

Сокращения: PCSK9 — пропротеин-конвертаза субтилизин кексинавого типа 9, апоВ100 — апо-белок В100, апо(a) — апо-белок(a), apoCIII — апо-белокCIII, ANGPTL3 — ангиопоэтин-подобный белок 3, МкАт — моноклональные антитела, мРНК — матричная (информационная) РНК, РНКазуN — эндонуклеаза, расщепляющая двуцепочечную РНК в ядре клетки, RISC — RNA Induced Silencing Complex — РНКазуN подобная нуклеаза, состоящая из нескольких субъединиц, ХС-ЛНП — холестерин липопротеидов низкой плотности.

Таблица 1

Новые биологические гиполипидемические препараты (статус июнь 2018г)

Препарат/ фирма разработчик или производитель	Целевая молекула	Структура	Механизм действия	Вероятность "off target" эффекта	Эффективность (снижение %)	Частота введения	Применение или стадия КИ
Пралуент (алирокумаб)/ Sanofi US and Regeneron Pharmaceuticals Inc., США	PCSK9	человеческие МкАт IgG1	Ингибирует активность фермента в плазме	средняя	60% ХС ЛНП	подкожное введение еженедельно или дважды в месяц	разрешено к применению в России, Европе, США
Репата (эволюкумаб)/Амжен, США		человеческие МкАт IgG2					
Эвинакумаб/Regeneron Pharmaceuticals Inc, США	ANGPTL3	человеческие МкАт	Связывает белок в плазме		76% ТГ	внутривенное или подкожное введение	III фаза
Кинамро (мипомерсен)/ Ionis Pharmaceuticals Inc, США	apoB100	АСО 2'-МОЕ гапмер	Блокирует синтеза белка в клетке на уровне трансляции мРНК через РНКазуН	высокая	60% ХС ЛНП	подкожное введение еженедельно	разрешено к применению в США
IONIS-APO(a) _{Rx} и IONIS-APO(a) _{L_{Rx}} /Ionis Pharmaceuticals Inc, США	apo(a)				90% Лп(a)		IIa фаза
apoCIII (Воланесорсен)/Ionis Pharmaceuticals Inc, США	apoCIII				60% ХС ЛНП		II фаза
IONIS- ANGPTL3-L _{Rx} /Ionis Pharmaceuticals Inc, США	ANGPTL3				60% ХС ЛНП		I фаза
Инклизиран/Alnylam Pharmaceuticals Inc, США	PSCK9	киРНК	Блокирует синтез белка в клетке на уровне трансляции мРНК по механизму РНК интерференции с образование комплекса RISC	высокая	50% ХС ЛНП	подкожное введение дважды в год	III фаза

Примечание: адаптировано из Nordestgaard [43].

Сокращения: PCSK9 — пропротеин-конвертаза субтилизин кексинового типа 9, apoB100 — апобелок B100, apo(a) — апобелок(a), apoCIII — апобелокCIII, ANGPTL3 — ангиополитин-подобный белок 3, МкАт — моноклональные антитела, IgG1 — иммуноглобулины G 1 изотипа, IgG2 — иммуноглобулины G 2 изотипа, АСО — антисмысловый олигонуклеотид, 2'-МОЕ — гапмер-химерная конструкция содержащая 2'-О-метоксиэтил/тиофосфатную модификацию олигонуклеотидов, мРНК — матричная РНК, киРНК — короткая интерферирующая РНК, РНКазан — эндонуклеаза, расщепляющая двуцепочечную РНК в ядре клетки, RISC — RNA induced silencing complex — РНКазан подобная нуклеаза, состоящая из нескольких субъединиц, ХС-ЛНП — холестерин липопротеидов низкой плотности.

ентов с гомозиготной формой СГХС недавно показали при проведении "post-hoc" анализа данных III фазы КИ [8]. Промежуточные результаты долгосрочного исследования эффективности и безопасности 200 мг мипомерсена в течение 104 нед. показали стабильное уменьшение концентрации ХС-ЛНП на 28% начиная от 26 нед. до окончания наблюдения [9], преимущественно воздействуя на наиболее атерогенные подфракции мелких плотных липопротеидов низкой плотности (ЛНП) [10]. Окончательные результаты оценки эффективности мипомерсена у 104 больных, получавших терапию более 12 мес. продемонстрировали значимое (с 64% до 10% пациентов или 25,7 до 3,9 случаев на 1000 пациентов-месяцев, относительный риск (ОР) 0,053 (95% доверительный интервал (ДИ), 0,016-0,168), $p < 0,0001$) снижение сердечно-сосудистых осложнений (ССО), таких как сердечно-сосудистая смерть, нефатальный инфаркт миокарда (ИМ), госпитализация по поводу неста-

бильной стенокардии, реваскуляризация миокарда и нефатальный ишемический инсульт [11]. Препарат не разрешен для применения в Европе и России.

Другой перспективной мишенью для воздействия на уровень ХС-ЛНП может служить пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9). PCSK9 синтезируется в печени, почках и тонкой кишке и играет важную роль в липидном обмене за счет регуляции деградации ЛНП рецептора в печени. Первые результаты о высокой эффективности препарата АСО второго поколения против PCSK9 [12] и создание еще более эффективных препаратов коротких АСО третьего поколения, содержащих LNA-модификацию были опубликованы более 10 лет назад [13]. Не менее обнадеживающие результаты были получены и при исследовании 14-звенного LNA-модифицированного олигонуклеотида против PCSK9 у приматов и человека. Полученный эффект 50% снижения ХС-ЛНП на фоне хорошей переноси-

мости препарата, отсутствия токсичности и повышения уровня печеночных ферментов (АСТ и АЛТ) делало препарат перспективным для лечения статин-резистентных больных [14]. Однако разработка АСО к PCSK9 проводившаяся в компании “Santaris Pharma A/S”, Дания (в настоящее время компания “Roche”, Швейцария), была прекращена в ходе КИ I фазы в 2011 году [5]. Одно из возможных объяснений прекращения испытаний связано с побочными эффектами от введения препарата [15]. Также I фаза КИ АСО к PCSK9 была прекращена “Bristol Myers Squibb”, США в 2010 году.

Наиболее перспективным оказался подход с использованием механизма РНК-интерференции на основе киРНК встроенных в липидную наночастицу, облегчающую доставку препарата “ALN-PCS” (Alnylam Pharmaceuticals, США). Высокая эффективность для снижения уровня PCSK9 и ХС-ЛНП была продемонстрирована на мышах, крысах и приматах. При этом у обезьян однократное внутривенное введение препарата киРНК, приводило к быстрому, долговременному (до 3 нед.) и обратимому снижению уровня PCSK9 и ХС-ЛНП в плазме [16]. По результатам I фазы КИ на 32 здоровых добровольцах с уровнем ХС-ЛНП выше 3 ммоль/л внутривенное введение препарата “ALN-PCS” приводило к дозозависимому снижению уровней PCSK9 и ХС-ЛНП в плазме (70% и 40% на максимальной дозе, соответственно). Продолжительность действия препарата составила 2-3 нед. после введения [17].

Конъюгирование киРНК с N-ацетилгалактозаминном, обеспечивающим сродство к асиалогликопротеиновым рецепторам гепатоцитов [18], а также введение дополнительных химических модификаций, повышающих его стабильность, позволило разработать еще более эффективный и безопасный препарат, получивший название “Инклизиран”.

В последнее время фирма “Alnylam Pharmaceuticals”, США провела еще одно КИ I фазы с подкожным ведением ALN-PCS, которое продемонстрировало устойчивое снижение PCSK9 и ХС-ЛНП в течение 180 дней после однократной инъекции [19]. Разовое введение инклизирана в дозе 300 мг и выше, так же как и ежемесячное (300 мг) или раз в 2 нед. (125 мг) введение препарата приводили к значимому (на 84% и 60%) снижению уровня циркулирующих PCSK9 и ХС-ЛНП через 84 дня после инъекции первой дозы [19].

В КИ фазы II ORION-1 показан выраженный гиполипидемический эффект при введении в дозах до 300 мг инклизирана 1 раз в 3 мес. подкожно. Снижение концентрации ХС-ЛНП было дозозависимым: на 41,9% после первой дозы и на 52,6% после повторной дозы [20]. В настоящее время планируются несколько КИ III фазы по оценке эффективности снижения липидов и сердечно-сосудистых исходов

с участием около 3600 пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) или СГХС (открытая база данных о проведении КИ ClinicalTrial.gov).

АСО для снижения концентрации Лп(а). Повышенный уровень Лп(а) является независимым, генетическим фактором риска возникновения и развития атеросклероза различных локализаций, ИБС, ССО и стеноза аортального клапана [21, 22]. Уровень Лп(а) контролируется на генетическом уровне и устойчив к существующим гиполипидемическим препаратам [21]. Такие инновационные препараты, как мипомерсен, алирокумаб и эволокумаб способны незначительно снижать концентрацию Лп(а) на 20-30% [23, 24]. Первые результаты специфического воздействия на уровень апо(а) с использованием АСО у трансгенных мышей появились в 2011г [25]. После введения препарата АСО, направленного на участок мРНК, кодирующий IV крингл 2-го типа (KIV₂) молекулы апо(а), в дозе 50 мг/кг/нед. в течение 6 нед., уровни Лп(а) и апо(а) были снижены на 25 и 19 %, соответственно.

Препарат IONIS-APO(a)_{Rx} — АСО второго поколения (“Ionis Pharmaceuticals Inc”, США) находится на II фазе КИ [26]. В настоящее время получены результаты рандомизированного, двойного-слепого, плацебо-контролируемого КИ, проведенного на базе 13 исследовательских центров в Канаде, Нидерландах, Германии, Дании и Англии.

В исследование было включено 64 участника с ССЗ и повышенным уровнем Лп(а), 35 из которых получали IONIS-APO(a)_{Rx}. В среднем снижение уровня Лп(а) составило 70% за 3 мес. Это было первое КИ, оценивающее специфическое медикаментозное воздействие на концентрацию Лп(а) у пациентов с гиперлипидемией(а) с использованием АСО. Наряду с достоверным снижением Лп(а) в исследовании было отмечено умеренное снижение ХС-ЛНП, апоВ100 и окисленных фосфолипидов, связанных с апоВ и апо(а). Снижение уровня Лп(а) привело к обратимому уменьшению воспалительной активации моноцитов, что подтверждает гипотезу о возможной провоспалительной роли Лп(а) в атерогенезе [27].

Препарат IONIS-APO(a)-L_{Rx} это фактически IONIS-APO(a)_{Rx} конъюгированный с фрагментом N-ацетил-галактозамина (GalNAc3), который обеспечивает адресную и преимущественную доставку препарата в печень, проходит начальные фазы КИ (фаза I/IIa). Опубликованы результаты рандомизированного, плацебо-контролируемого, двойного слепого исследования с включением 58 здоровых добровольцев с исходным уровнем Лп(а) >30 мг/дл [27]: 28 участников, разбитых на несколько групп получали дозы от 10 до 120 мг препарата, 30 человек получали препарат в дозе от 10 до 40 мг с постепенной титрацией дозы от 60 до 240 мг. Дозозависимое снижение

концентрации Лп(а) отмечалось во всех группах, получавших однократную дозу препарата на 30-й день. У пациентов на возрастающей дозе препарата IONIS-APO(a)-L_{Rx} снижение уровня Лп(а) достигало 92±6,5% в группе 40 мг на 36-й день [27]. Необходимо отметить, что химическая модификация препарата комплексом GalNAc3, обеспечивающая повышенное сродство к гепатоцитам через асиалогликопротеиновый рецептор, увеличило эффективность IONIS-APO(a)-L_{Rx} по сравнению с исходным АСО, что позволило на порядок уменьшить дозу препарата и значительно улучшить его переносимость [27]. В марте 2017 года начато КИ II фазы с участием 270 больных ССЗ с гиперлипидемией(а), проводимое на базе 26 исследовательских центров в США, Канаде, Дании, Германии, Нидерландах, окончание исследования ожидается в ноябре 2018г (открытая база данных о проведении КИ ClinicalTrial.gov).

АСО для снижения уровня ТГ в крови. Антисенс-технологии открыли широкую перспективу для попытки воздействия на концентрацию ТГ с использованием в качестве мишеней генов многочисленных белков, вовлеченных в их метаболизм [7]. Одной из наиболее очевидных мишеней является апоСIII, из-за связи данного апобелка с развитием триглицеридемии, атеросклероза, ССЗ и других метаболических нарушений [28, 29]. Генетические исследования свидетельствуют о положительном влиянии пониженного уровня апоСIII на уровень ТГ и атерогенных апоВ100-содержащих липопротеидов, а также на продолжительность жизни [30].

Доклинические исследования АСО на различных моделях трансгенных крыс и мышей продемонстрировали значимое снижение уровней апоСIII, ТГ и общего холестерина, увеличение концентрации ХС-ЛВП, сопровождавшихся регрессией атеросклеротических поражений аорты. Кроме того, подавление синтеза апоСIII у трансгенных крыс приводило к улучшению чувствительности к инсулину, что соответствует наблюдениям в нескольких популяциях с мутацией в гене апоСIII. Разработка терапевтического препарата IONIS-APOCIII_{Rx} (воланесорсен) на основе АСО второго поколения, блокирующий синтез апоСIII, также ведется фирмой “Ionis Pharmaceuticals, Inc”, США. Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое КИ I фазы, продемонстрировало устойчивое дозозависимое и продолжительное снижение уровней апоСIII и ТГ в плазме здоровых добровольцев [31]. Последующее КИ фазы II было проведено у трех пациентов с наследственным синдромом хиломикронемии с концентрацией ТГ от 1406 до 2083 мг/дл, и продемонстрировало резкое 71-90% снижение уровня апоСIII и ТГ (56-86%) в плазме за 13 нед. лечения [32]. Другое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование фазы II у пациентов с гипертри-

глицеридемией продемонстрировало дозозависимые эффекты препарата для снижения белка апоСIII и ТГ как при монотерапии (до 80 и 71%, соответственно на максимальной дозе 300 мг), так и совместно с приемом фибратов [33]. Безопасность и эффективность препарата в настоящее время изучается в рамках III фазы КИ для лечения наследственных форм триглицеридемии и семейной липодистрофии. Ожидаются результаты рандомизированного двойного слепого 12-месячного плацебо-контролируемого исследования APPROACH, с включением 50 пациентов с синдромом наследственной хиломикронемии, и уровнем ТГ 750 мг/дл. В 2015 году исследование BROADEN начало регистрировать пациентов с семейной частичной липодистрофией [34]. В клиническом наблюдении за 22 больными с наследственным синдромом хиломикронемии в рамках КИ ReFOCUS инъекции воланесорсена в течение 7 мес. показали эффективность в снижении симптомов заболевания на одного пациента, оцениваемых в клинической, физической и эмоционально-когнитивной сферах [35].

Недавно было описано семейство секреторных белков, названных “ангиопоэтин-подобными белками” (ANGPTLs), имеющими структурное сходство с ангиопоэтинами, ключевыми звеньями ангиогенеза, которые также оказывают влияние на метаболизм липидов. По результатам нескольких исследований ANGPTL3 играет важную роль в регуляции липидного обмена, ингибируя активность липопротеин-липазы и эндотелиальной липазы. Инактивация *Angptl3* у мышей эффективно снижала уровень ТГ, ХС-ЛНП, а также размер атеросклеротического поражения [36], тем самым сделав ANGPTL3 новой терапевтической мишенью для лечения дислипидемии и ССЗ [37].

IONIS-ANGPTL3-L_{Rx} представляет собой 20-звенный АСО второго поколения содержащий модификации, аналогичные вышеописанным для других препаратов этой же фармкомпании. В рандомизированное, двойное слепое плацебо-контролируемое КИ I фазы, для оценки безопасности, профиля побочных реакций, фармакокинетики и фармакодинамики было включено 44 взрослых добровольца в возрасте от 18 до 65 лет. Подкожные инъекции IONIS-ANGPTL3L_{Rx} в разовых дозах от 20 до 80 мг или в нескольких дозах от 10 до 60 мг в нед. в течение 6 нед. приводили к дозозависимому снижению уровня ANGPTL3 до 85%, ТГ до 63% и ХС-ЛНП до 33%, ХС-ЛОЛНП до 60,0%, апоВ100 до 25,7% и апоС-III до 58,8% после 6 нед. лечения [36]. За время исследования не было отмечено никаких серьезных побочных реакций.

Безопасность и переносимость терапевтических препаратов АСО. Самый большой массив данных о безопасности и переносимости препаратов на основе АСО накоплен фирмой “Ionis Pharmaceuticals Inc, США”. Единообразие структуры и универсаль-

ность механизма действия через РНКазу H позволяет рассчитывать на подобный профиль безопасности для всей линейки препаратов, вне зависимости от последовательности олигонуклеотидов.

Наиболее частыми общими побочными реакциями после введения АСО были кожная реакция в месте введения и гриппоподобные симптомы. Реакции в месте введения, наблюдаемые в исследованиях препарата мипомерсен и АРО(а)_{Rx}, как правило, зависели от дозы введенного препарата и проявлялись в виде эритемы от легкой до умеренной степени, возникающей в течение 24 ч после введения препарата [7]. Нужно отметить, что препараты нового поколения благодаря адресной доставке в гепатоциты и повышенной стабильности сохраняют свою эффективность в более низких дозах, что приводит к меньшему количеству побочных реакций.

При введении мипомерсена во всех КИ III фазы наблюдалось повышение трансаминаз, жировая дистрофия печени, которая не прогрессировала и имела обратимый характер после отмены препарата [5, 34, 38, 39].

Несмотря на одобрение препарата в США, Европейское Агентство по лекарственным средствам отказало в регистрации препарату мипомерсен (торговая марка “Купамро™” “ISIS Pharmaceuticals Inc” и “Sanofi’s Genzyme”) для лечения больных СГХС, из-за неблагоприятного профиля безопасности. Более половины (55%) пациентов прекратили прием лекарства в течение двух лет, в основном из-за побочных эффектов, таких как гриппоподобные симптомы, кожные реакции в месте введения и гепатотоксичность, причем в КИ участвовали пациенты с тяжелой СГХС, практически не имеющие альтернативных вариантов лечения, за исключением процедур терапевтического афереза липопротеидов. Увеличение частоты серьезных сердечно-сосудистых событий в группе пациентов, принимающих мипомерсен, относительно группы плацебо, одновременно с необходимостью длительного приема препарата, привели Европейскую комиссию к заключению, что возможная польза не превышает риски от применения препарата.

В исследовании II фазы IONIS-ARO(а)_{Rx} было зарегистрировано два инфаркта миокарда, по одному в исследуемой группе и группе плацебо, но ни один из них не считался связанным с лечением. 12% инъекций IONIS-ARO(а)_{Rx} вызывали реакции в месте введения, тогда как IONIS-ARO(а)-L_{Rx} не вызывал кожных реакций на инъекции, возможно, из-за существенно меньшей дозы препарата [27]. При приеме других препаратов серьезных побочных реакций отмечено не было.

Профиль безопасности киРНК, используемых в качестве терапевтического агента, пока крайне ограничен, при этом такие препараты имеют более сложный путь воздействия на целевую мРНК, чем

одноцепочечные АСО. Существует потенциальная опасность конкуренции киРНК, влияющих на целевую мРНК по механизму РНК-интерференции, с эндогенными микроРНК при образовании комплекса RISC [40]. Также было описано подавление экспрессии генов отличных от гена-мишени — так называемый “off-target” эффект, который может привести к нежелательным последствиям и потенциальной трансформации клеток [41]. Другой возможной проблемой может являться активация иммунного ответа на введение киРНК [4].

Несколько исследований киРНК были остановлены преждевременно, и разработка препаратов прекращена ввиду побочных эффектов, связанных с гепатотоксичностью и повышенной смертностью [42]. Учитывая длительный срок действия таких препаратов, долгосрочную безопасность и эффективность терапии киРНК необходимо исследовать в более длительных и крупных клинических испытаниях [43].

Химическая модификация как одноцепочечных АСО, так и киРНК, позволяющая существенно увеличить стабильность препаратов к действию эндонуклеаз, может оказаться токсичной при длительном или высокодозовом воздействии [43].

До появления доказательств долгосрочной безопасности препаратов на основе АСО они могут использоваться для лечения больных с орфанными заболеваниями, не имеющими альтернативных методов коррекции нарушений [43]. Вместе с тем в развитии АСО технологий, этап “подтверждения гипотезы” можно считать успешно пройденным, а вопрос об эффективности действия гиполипидемических лекарственных препаратов на основе АСО доказанным.

Препараты на основе терапевтических моноклональных антител (МкАт)

Разработка лекарственных препаратов на основе МкАт является одной из наиболее активно развивающихся областей в современной фармакологии и иммунологии. Высокая специфичность терапевтических антител обеспечивает предсказуемость их эффектов. Универсальность технологичной платформы — закладывает возможность для масштабирования и получения препаративных количеств. К 2014г в США и Европе к использованию допущены 47 лекарственных препаратов на основе МкАт [44] и более 300 находятся на различных стадиях КИ по разным показаниям.

В настоящее время для коррекции гиперлипидемии препараты терапевтических МкАт, вышедшие в клинику или на начальную фазу КИ, ограничены двумя молекулами-мишенями — это PCSK9 и ANGPTL3.

Терапевтические МкАт против PCSK9. Параллельно с разработкой препаратов АСО для блокиро-

вания PCSK9 несколько исследовательских групп активно развивали направление получения новых лекарственных препаратов на основе терапевтических МкАт. В результате была разработана технология, позволяющая получить полностью гуманизированные (человеческие) МкАт специфичные к PCSK9. Гиполипидемический эффект таких препаратов (снижение уровня ХС-ЛНП на 60% от исходного) опосредуется через образование иммунного комплекса с циркулирующей в плазме молекулой PCSK9, что препятствует образованию комплекса с ЛНП-рецептором, с последующим увеличением количества функционирующих рецепторов к ЛНП. Необходимо отметить, что благодаря более благоприятному профилю безопасности препараты на основе терапевтических антител (эволокумаб и алирокумаб) в настоящее время достаточно широко используются в клинической практике.

Клинические исследования эволокумаба. Эволокумаб стал первым ингибитором PCSK9, одобренным к клиническому применению как в мире, так и в России. Для эволокумаба была разработана научная программа PROFICIO, состоящая из ключевых исследований, выполненных в различных клинических ситуациях и у различных категорий больных высокого и очень высокого сердечно-сосудистого риска ($n > 35000$): гомо- и гетерозиготная формы СГХС, непереносимость статинов, стабильная ИБС и ее эквиваленты в виде атеросклеротических ССЗ. Ключевыми можно считать 3 исследования: GLAGOV, FOURIER и OSLER. В исследовании GLAGOV (Global Assessment of Plaque regression With a PCSK9 antibody as Measured by intraVascular Ultrasound — Комплексная оценка регрессии бляшки методом внутрисосудистого ультразвука при использовании антител к PCSK9), включившего 970 пациентов с показаниями для коронарной ангиографии, с применением внутрисосудистого ультразвукового исследования было продемонстрировано, что терапия эволокумабом наряду со статинами в течение 78 нед. приводит к достоверному уменьшению объема атеросклеротической бляшки на 1% (абсолютная величина по всем срезам) или на $4,9 \text{ мм}^3$ [44]. Важно отметить, что, несмотря на значимое снижение уровня ХС-ЛНП и поддержания его менее $0,65 \text{ ммоль/л}$ не происходит увеличения вероятности развития каких-либо побочных эффектов. Опыт непрерывного 4-летнего использования эволокумаба в рамках программы OSLER свидетельствует, что при длительном применении гиполипидемический эффект эволокумаба не ослабевает и не ассоциируется с увеличением риска развития осложнений [46].

Исследование FOURIER (Further cardiovascular Outcomes Research with PCSK9 Inhibition in subjects with Elevated Risk Дальнейшее изучение сердечно-сосудистых исходов при ингибировании PCSK9 у лиц

с повышенным риском) было посвящено оценке клинической эффективности и безопасности длительной комбинированной терапии эволокумабом и статинами у 27564 пациентов в возрасте 40–85 лет с атеросклеротическими ССЗ (ИМ, инсульт, симптомный периферический атеросклероз) [47]. Помимо этого, для включения в исследование пациент должен был иметь не менее 1 фактора риска атеросклероза, а также уровень ХС-ЛНП $\geq 1,8 \text{ ммоль/л}$ на фоне терапии аторвастатином в дозе не менее 20 мг (или эквивалентной — другого статина). Была подтверждена высокая гиполипидемическая эффективность эволокумаба: уровень ХС-ЛНП снизился на 59% от значений с $2,40 \text{ ммоль/л}$ до $0,78 \text{ ммоль/л}$. За 2,2 года наблюдения доказано, что применение более агрессивной гиполипидемической терапии приводит к снижению частоты первичной конечной точки (смертельные исходы от сердечно-сосудистых причин, ИМ, инсульт, госпитализаций по поводу нестабильной стенокардии и реваскуляризация миокарда) на 15%, а вторичной точки (сердечно-сосудистая смерть, ИМ или инсульт) — на 20%.

В дальнейшем были опубликованы очень важные результаты нескольких исходно запланированных протоколом субанализов исследования FOURIER.

Целью дополнительного, заранее спланированного анализа, было определение связи между границами и степенью снижения уровня ХС-ЛНП и частоты ССО [48]. В этот анализ были включены 25982 человек (94% от общего количества рандомизированных, 13013 на эволокумабе, 12969 — плацебо). Их ранжировали по уровню достигнутого к 4-й неделе лечения ХС-ЛНП на 5 подгрупп: $< 0,5 \text{ ммоль/л}$ ($n=2669$), $0,5\text{--}1,3 \text{ ммоль/л}$ ($n=8003$), $1,4\text{--}1,8 \text{ ммоль/л}$ ($n=3444$), $1,9\text{--}2,6 \text{ ммоль/л}$ ($n=7471$), $> 2,6 \text{ ммоль/л}$ ($n=4395$). Было отмечено, что при снижении ХС-ЛНП вплоть до $0,2 \text{ ммоль/л}$ ($7,7 \text{ мг/дл}$) уменьшается частота ССО без увеличения риска нежелательных явлений. Однако статистически значимое снижение частоты событий из первичной и вторичной конечных точек было показано только в первых двух подгруппах низких значений ХС-ЛНП, т.е. менее $0,5$ и $1,3 \text{ ммоль/л}$: на 24% и 15% (ОР = $0,76$ ($0,64\text{--}0,90$)) и $0,85$ ($0,76\text{--}0,96$)) для первичной точки и на 31% и 25% ($0,69$ ($0,56\text{--}0,85$)) и ($0,75$ ($0,64\text{--}0,86$)) для вторичной точки, соответственно. В связи с полученными данными, авторы отметили целесообразность пересмотра целевого уровня ХС-ЛНП в современных рекомендациях для лиц очень высокого сердечно-сосудистого риска [48].

Более 11000 (40%) человек имели сахарный диабет (СД). Эволокумаб снижал относительный риск наступления первичной конечной точки на 17% и 13%, а ключевой вторичной конечной точки на 18% и 22% у лиц с наличием и отсутствием СД соответственно, при этом не было отличий между группами

по частоте нежелательных явлений, динамике уровня HbA_{1c} и глюкозы натощак, равно как и новых случаев сахарного диабета (ОР = 1,05; 0,94-1, 17) в том числе среди лиц с предиабетом (ОР = 1,00; 0,89-1,13) [49].

У 3642 пациентов (13,2%), включенных в исследование FOURIER, исходно был диагностирован симптомный атеросклероз артерий нижних конечностей, из них у 43% был СД. На фоне терапии эволокумабом было показано значимое снижение первичной конечной точки на 21% и 14%, вторичной конечной точки — на 27% и 19% среди лиц, имевших и не имевших периферический атеросклероз, соответственно. Было также показано, что эволокумаб способствует снижению на 42% относительного риска наступления осложнений, связанных с кровоснабжением нижних конечностей (острая ишемия нижних конечностей, большие ампутации или экстренная реваскуляризация) [50].

В подисследовании FOURIER по оценке нейрокогнитивной функции (EBBINGHAUS Evaluating PCSK9 Binding antiBody Influence on coGnitive HeAlth in high cardiovasUlar risk Subjects) вошло 1972 человека, было показано, что терапия эволокумабом в течение 20 мес. не приводила к ухудшению показателей нейрокогнитивной функции по сравнению с плацебо [51].

Клинические исследования алирокумаба. Алирокумаб также является полностью человеческим моноклональным антителом, производится с использованием технологии рекомбинантной ДНК и обладает высоким сродством и специфичностью к PCSK9. Гиполипидемический эффект алирокумаба сопоставим с таковым эволокумаба. На его эффективность не влияют умеренная дисфункция печени и почек. Алирокумаб может применяться одновременно со статинами (аторвастатином и розувастатином) и эзетимибом. При этом алирокумаб не изменяет их концентрацию в плазме и не влияет на метаболизм этих препаратов печеночными ферментами CYP3A4 и CYP2C9. С 2012 г проводится масштабная исследовательская программа ODYSSEY (n>22000), которая состоит из 14 КИ, в которых оценивается эффективность алирокумаба у пациентов с высоким и очень высоким сердечно-сосудистым риском.

В исследовании ODYSSEY LONG TERM 1553 пациентам добавили к терапии статинами подкожные инъекции алирокумаба в дозе 150 мг каждые 2 нед., в контрольной группе 788 участников получали инъекции плацебо. Алирокумаб приводил к стойкому снижению уровня ХС-ЛНП на 61% от исходных значений. Ретроспективный анализ показал существенное снижение риска ССО на 48% среди пациентов, получавших алирокумаб (p=0,02) [52]. Возможность применения алирокумаба при остром коронарном синдроме, а также влияние этого препарата

на течение и прогноз хронических атеросклеротических ССЗ изучались в крупном рандомизированном исследовании ODYSSEY OUTCOMES [53] с участием почти 19000 пациентов с недавним (менее одного года) острым коронарным синдромом. Результаты исследования до сих пор не опубликованы, но были оглашены в марте 2018г на открытии научной сессии Американской коллегии кардиологов в г. Орlando (США). Как и в исследовании FOURIER, при применении алирокумаба было получено снижение частоты развития основных сердечно-сосудистых осложнений, а также общей смертности на 15%.

В рандомизированном исследовании ODYSSEY-ESCAPE больные, находившиеся по клиническим показаниям на регулярном экстракорпоральном ЛНП-аферезе, были распределены в соотношении 2:1 в группу подкожных инъекций алирокумаба в дозе 150 мг каждые 2 нед. (n=41) или плацебо (n=21) в течение 18 нед. Первичной точкой служила частота процедуры в течение 12 нед. (недели 7-18), стандартизованная по количеству включенных пациентов. В группе алирокумаба отмечено значимое снижение уровня ХС-ЛНП на 54% от исходного уровня к 6 нед. Применение алирокумаба снизило потребность в ЛНП-аферезе на 75%, у 63% пациентов выраженное снижение ХС ЛНП позволило отказаться от проведения ЛНП-афереза [54].

Терапевтические МкАт против ANGPTL3. Исследование безопасности и эффективности различных доз и режимов дозирования препарата эвинакумаба (Regeneron Pharmaceuticals) у 252 пациентов с СГХС, устойчивой к гиполипидемической терапии проводится в рамках рандомизированного, двойного слепого, плацебо-контролируемого КИ II фазы КИ. В настоящее время опубликованы результаты I фазы КИ для оценки профиля безопасности и фармакодинамики. В рандомизированное плацебо-контролируемое двойное слепое КИ были включены здоровые добровольцы в возрасте от 18 до 65 лет с уровнем ТГ натощак 150-450 мг/дл (1,7-5,1 ммоль/л) или ХС-ЛНП более 100 мг/дл (2,6 ммоль/л) на литр). 62 из 83 добровольцев получали препарат эвинакумаб подкожно или внутривенно. Максимальное снижение уровня липидов у пациентов, получавших внутривенно 20 мг/кг эвинакумаба, были следующими: ТГ — 76% на 4 день; ХС-ЛНП — 23% и ХС-ЛВП — 18% на 15 день, соответственно. Влияние препарата на активность липопротеинлипазы увеличивало гидролиз ТГ-обогащенных частиц липопротеидов, тогда как снижение ХС-ЛВП было опосредовано влиянием на активность эндотелиальной липазы. По мнению исследователей препарат МкАт может быть эффективен для коррекции ХС-ЛНП у пациентов с гомозиготной формой СГХС с отсутствием ЛНП рецептора, поскольку может действовать на клиренс ЛНП по механизму, не зависящему от рецептора

ЛНП, а также других известных механизмов [55]. Согласно базе данных КИ, проводимых по всему миру в 2018 году, запланировано несколько исследований для оценки эффективности и безопасности применения эвинакумаба у пациентов с гомозиготной формой СГХС и гиперлипопротеидемий IIa в рамках III фазы КИ в Канаде, США, Греции и Австрии (ClinicalTrials.gov).

Вопросы безопасности лечения с использованием терапевтических МкАт. Способность ингибиторов PCSK9 снижать уровни ХС ЛНП до крайне низких значений подняла вопросы безопасности такого лечения. Для ответа на них Robinson J, et al. изучили суммарную частоту побочных эффектов в 14 исследованиях программы ODYSSEY [52]. Авторы проанализировали данные 3340 пациентов, получавших алирокумаб, и 1894 пациентов групп сравнения (у которых применяли плацебо или эзетимиб). Продолжительность лечения алирокумабом в этих исследованиях варьировала в диапазоне 52–104 нед. Авторы сравнили частоту побочных эффектов среди лиц, у которых уровень ХС-ЛНП на фоне лечения оказался $>0,65$ ммоль/л (2501 человек) и среди тех пациентов, у которых этот показатель был ниже указанного порога: $<0,65$ ммоль/л (839 человек) и $<0,39$ ммоль/л (314 человек). Даже при таком выраженном снижении уровней ХС-ЛНП авторы не обнаружили достоверного отрицательного действия алирокумаба на нейромышечные симптомы,

на когнитивные расстройства и на функциональные показатели печени.

Наиболее частым нежелательным явлением среди пациентов, получавших эвинакумаб, была головная боль (7 пациентов, 11%), повышение уровня АЛТ более чем в 3 раза относительно верхнего предела нормальных значений наблюдалось у 2 (3%) пациентов. Никто из участников исследования не прекратил прием препарата из-за серьезных неблагоприятных событий [55].

Таким образом, после разработки в последнее десятилетие новых поколений биотехнологических препаратов для успешной коррекции уровня атерогенных липопротеидов и достижения их целевых уровней, доказательства эффективности и безопасности их использования в рамках обширных международных программ клинических исследований — происходит очень быстрое внедрение таких препаратов в клиническую практику, что дает врачам дополнительные возможности снижения сердечно-сосудистого риска у больных с тяжелыми и сложными нарушениями липидного обмена. Терапевтические возможности с использованием новых поколений биологических гиполипидемических лекарственных препаратов постоянно расширяются.

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

Литература

1. 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. doi:10.1038/nature09270.
2. 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. doi:10.1097/MOL.0b013e32834469b3.
3. Rayner KJ, Fernandez-Hernando C, Moore KJ. MicroRNAs regulating lipid metabolism in atherogenesis. *Thromb Haemost.* 2012; 07(4):642–7. doi:10.1160/TH11-10-0694.
4. Afanasieva OI, Pokrovski SN. Lipid metabolism correction by antisense technology. *Ration Pharmacother Cardiol* 2013;9(5):532–41. (In Russ) Афанасьева О.И., Покровский С.Н. Коррекция липидного обмена с использованием антисенс-технологий. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2013;9(5):532–41. doi:10.20996/1819-6446-2013-9-5-532-541.
5. Visser ME, Witztum JL, Stroes ES, Kastelein JJ. Antisense oligonucleotide for the treatment of dyslipidaemia. *Eur. Heart Jour.* 2012;33:1451–8. doi:10.1093/eurheartj/ehs084.
6. Santos RD, Raal FJ, Catapano AL, et al. Mipomersen, an antisense oligonucleotide to apolipoprotein B-100, reduces lipoprotein(a) in various populations with hypercholesterolemia: results of 4 phase III trials. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2015;35:689–99. doi:10.1161/ATVBAHA.114.304549.
7. Crooke RM, Graham MJ. Therapeutic potential of antisense oligonucleotides for the management of dyslipidemia. *Clin. Lipidol.* 2011;6(6):675–92. doi:10.2217/clp.11.59.
8. Raal FJ, Braamskamp MJ, Selvey SL, et al. Pediatric experience with mipomersen as adjunctive therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *J. Clin. Lipidol.* 2016;10:860–69. doi:10.1016/j.jacl.2016.02.018.
9. Santos RD, Duell PB, East C, et al. Long-term efficacy and safety of mipomersen in patients with familial hypercholesterolemia: 2-year interim results of an open-label extension. *Eur Heart J.* 2015;36(9):566–75. doi: 10.1093/eurheartj/ehs459.
10. Santos RD, Raal FJ, Donovan JM, Cromwell WC. Mipomersen preferentially reduces small low-density lipoprotein particle number in patients with hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol.* 2015;9(2):201–9. doi:10.1016/j.jacl.2014.12.008.
11. Duell PB, Santos RD, Kirwan BA, et al. Long-term mipomersen treatment is associated with a reduction in cardiovascular events in patients with familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol.* 2016;10(4):1011–21. doi:10.1016/j.jacl.2016.04.013.
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.
13. 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. doi:10.1371/journal.pone.0010682.
14. 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. doi:10.1038/mt.2011.260.
15. van Poelgeest EP, Hodges MR, Moerland M, et al. Antisense-mediated reduction of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): a first-in-human randomized, placebo-controlled trial. *Br J Clin Pharmacol.* 2015;80(6):1350–61. doi:10.1111/bcp.12738.
16. Frank-Kamenetsky M, Grefhorst A, Anderson NN, et al. Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(33):11915–20. doi:10.1073/pnas.0805434105.
17. Fitzgerald K, Frank-Kamenetsky M, Shulga-Morskaya S, et al. Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet.* 2014;383:60–8. doi:10.1016/S0140-6736(13)61914-5.
18. Nair JK, Willoughby JL, Chan A, et al. Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J Am Chem Soc.* 2014;136:16958–61. doi:10.1021/ja505986a.
19. Fitzgerald K, White S, Borodovsky A, et al. A highly durable RNAi therapeutic inhibitor of PCSK9. *N Eng J Med.* 2017;376(1):41–51. doi:10.1056/NEJMoa1609243.
20. Ray KK, Landmesser U, Leiter LA, et al. Inclisiran in Patients at High Cardiovascular Risk with Elevated LDL Cholesterol. *N Engl J Med.* 2017;376(15):1430–40. doi:10.1056/NEJMoa1615758.
21. Kronenberg F, Utermann G. Lipoprotein(a): resurrected by genetics. *J Int Med* 2013;273:6–30. doi:10.1111/j.1365-2796.2012.02592.x.
22. Thanassoulis G. Lipoprotein(a) in calcific aortic valve disease: from genomics to novel drug target for aortic stenosis. *J Lipid Res* 2016; 57: 917–24. doi:10.1194/jlr.R051870.
23. Raal FJ, Santos RD. Homozygous familial hypercholesterolemia: current perspectives

- on diagnosis and treatment. *Atherosclerosis*. 2012;223(2):262-8. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.02.019.
24. 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. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.786822.
25. Merki E, Graham MJ, Taleb A, et al. Antisense oligonucleotide lowers plasma levels of apolipoprotein(a) and lipoprotein(a) in transgenic mice. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(15):1611-21. doi:10.1016/j.jacc.2010.10.052.
26. Tsimikas S, Viney NJ, Hughes SG, et al. Antisense therapy targeting apolipoprotein(a): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 1 study. *Lancet*. 2015;10;386(10002):1472-83. doi:10.1016/S0140-6736(15)61252-1.
27. Viney NJ, van Capelleveen JC, Geary RS, et al. Antisense oligonucleotides targeting apolipoprotein(a) in people with raised lipoprotein(a): two randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trials. *Lancet*. 2016;388:2239-53. doi:10.1016/S0140-6736(16)31009-1.
28. Ooi EMM, Barrett HR, Chan DC, et al. Apolipoprotein CIII: understanding an emerging risk factor. *Clin. Sci*. 2008;114:611-24. doi:10.1042/CS20070308.
29. Olivieri O, Martinelli 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. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03720.x.
30. 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. doi:10.1073/pnas.1019553108.
31. Graham MJ, Lee RG, Bell TA III, et al. Antisense oligonucleotide inhibition of apolipoprotein C-III reduces plasma triglycerides in rodents, nonhuman primates, and humans. *Circ. Res*. 2013;112:1479-90. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.300367.
32. Gaudet D, Brisson D, Tremblay K, et al. Targeting APOC3 in the familial chylomicronemia syndrome. *N. Engl. J. Med*. 2014;371:2200-6. doi:10.1056/NEJMoa1400284.
33. Gaudet D, Alexander VJ, Baker BF, et al. Antisense inhibition of apolipoprotein C-III in patients with hypertriglyceridemia. *N. Engl. J. Med*. 2015;373:438-47. doi:10.1056/NEJMoa1400283.
34. Yamamoto T, Wada F, Harada-Shiba M. Development of Antisense Drugs for Dyslipidemia. *J Atheroscler Thromb*. 2016;23(9):1011-25. doi:10.5551/jat.RV16001.
35. Arca M, Hsieh A, Soran H, et al. The effect of volanesorsen treatment on the burden associated with familial chylomicronemia syndrome: the results of the ReFOCUS Study. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2018. doi: 10.1080/14779072.2018.1487290.
36. Graham MJ, Lee RG, Brandt TA, et al Cardiovascular and Metabolic Effects of ANGPTL3 Antisense Oligonucleotides. *N Engl J Med*. 2017;377(3):222-32. doi:10.1056/NEJMoa1701329.
37. Su X, Peng DQ. New insights into ANGPTL3 in controlling lipoprotein metabolism and risk of cardiovascular diseases. *Lipids Health Dis*. 2018;17(1):12. doi:10.1186/s12944-018-0659.
38. 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 hypercholesterolaemia: a randomised, doubleblind, placebocontrolled trial. *Lancet*. 2010;375: 998-1006. doi:10.1016/S0140-6736(10)60284-X
39. Visser ME, Kastelein JJ, Stroes ES. Apolipoprotein B synthesis inhibition: results from clinical trials. *Curr. Opin. Lipidol*. 2010;21(4):319-23. doi:10.1097/MOL.0b013e32833af4c1.
40. 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.
41. Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(2-3):75-86.
42. Garber K. Alnylam terminates revusiran program, stock plunges. *Nat Biotechnol*. 2016;34(12):1213-4. doi:10.1038/nbt1216-1213.
43. Nordestgaard BG, Nicholls SJ, Langsted A, et al. Advances in lipid-lowering therapy through gene-silencing technologies. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(5):261-72. doi:10.1038/nrcardio.2018.3.
44. Ecker D., Jones S., Levine H. The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs* 2015;7:9-14. doi:10.4161/19420862.2015.989042.
45. Nicholls SJ, Puri R, Anderson T, et al Effect of Evolocumab on Progression of Coronary Disease in Statin-Treated Patients: The GLAGOV Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2016;316(22):2373-84. doi:10.1001/jama.2016.16951.
46. Koren MJ, Sabatine MS, Giugliano RP, et al. Long-term Low-Density Lipoprotein Cholesterol-Lowering Efficacy, Persistence, and Safety of Evolocumab in Treatment of Hypercholesterolemia: Results Up to 4 Years From the Open-Label OSLER-1 Extension Study. *JAMA Cardiol*. 2017;2(6):598-607. doi:10.1001/jamacardio.2017.0747.
47. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, et al. FOURIER Steering Committee and Investigators. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2017;376(18):1713-22. doi:10.1056/NEJMoa1615664.
48. Giugliano RP, Pedersen TR, Park JG, et al. FOURIER Investigators. Clinical efficacy and safety of achieving very low LDL-cholesterol concentrations with the PCSK9 inhibitor evolucumab: a prespecified secondary analysis of the FOURIER trial. *Lancet*. 2017;390(10106):1962-71. doi:10.1016/S0140-6736(17)32290-0.
49. Sabatine MS, Leiter LA, Wiviott SD, et al. Cardiovascular safety and efficacy of the PCSK9 inhibitor evolucumab in patients with and without diabetes and the effect of evolucumab on glycaemia and risk of new-onset diabetes: a prespecified analysis of the FOURIER randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5(12):941-50. doi:10.1016/S2213-8587(17)30313-3.
50. Bonaca MP, Nault P, Giugliano RP, et al. Low-Density Lipoprotein Cholesterol Lowering With Evolocumab and Outcomes in Patients With Peripheral Artery Disease: Insights From the FOURIER Trial (Further Cardiovascular Outcomes Research With PCSK9 Inhibition in Subjects With Elevated Risk). *Circulation*. 2018;137(4):338-50. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032235.
51. Giugliano RP, Mach F, Zavitz K, et al. EBBINGHAUS Investigators. Design and rationale of the EBBINGHAUS trial: A phase 3, double-blind, placebo-controlled, multicenter study to assess the effect of evolucumab on cognitive function in patients with clinically evident cardiovascular disease and receiving statin background lipid-lowering therapy-A cognitive study of patients enrolled in the FOURIER trial. *Clin Cardiol*. 2017;40(2):59-65. doi:10.1002/clc.22678.
52. Robinson J, Rosenson RS, Farnier M, et al. Safety of Very Low Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels With Alirocumab: Pooled Data From Randomized Trials. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2017;69(5):471-82. doi:10.1016/j.jacc.2016.11.037.
53. Schwartz GG, Bessac L, Berdan LG, et al. Effect of alirocumb, a monoclonal antibody to PCSK9, on long-term cardiovascular outcomes following acute coronary syndromes: rationale and design of the ODYSSEY outcomes trial. *Am Heart J*. 2014;168(5):682-9. doi:10.1016/j.ahj.2014.07.028.
54. Moriarty PM, Parhofer KG, Babirak SP, et al. Alirocumab in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia undergoing lipoprotein apheresis: the ODYSSEY ESCAPE trial. *Eur Heart J*. 2016;37(48):3588-95. doi:10.1093/eurheartj/ehw388.
55. Dewey FE, Gusarova V, Dunbar RL, et al Genetic and Pharmacologic Inactivation of ANGPTL3 and Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2017;377(3):211-21. doi:10.1056/NEJMoa1612790.
56. Saonere J. Antisense therapy, a magic bullet for the treatment of various diseases: Present and future prospects. *Journal of Medical Genetics and Genomics*. 2011;3(5):77-83.