

## Изменения липидного обмена мыши при одновременном воздействии антисмысловыми олигонуклеотидными производными к мРНК генов *apoB*, *PCSK9* и *apoCIII*

С.И. Ошевский<sup>1</sup>✉, Ю.И. Рагино<sup>1</sup>, Е.В. Каштанова<sup>1</sup>, Я.В. Полонская<sup>1</sup>, Е.М. Стахнева<sup>1</sup>, В.П. Николин<sup>1</sup>, Н.А. Попова<sup>1,2</sup>, Н.А. Колчанов<sup>1</sup>, М.И. Воевода<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: oshevski@bionet.nsc.ru

Для пациентов с наследственной гиперхолестеринемией и/или не переносящих статины остается актуальной разработка новых средств, снижающих уровень «плохого» холестерина, например на основе антисмысловых олигонуклеотидных производных (АСО). Целью исследования была оценка изменения липидного обмена в вариантах совместного воздействия АСО, адресованными на мРНК его важнейших генов: *apoB*, *PCSK9* и *apoCIII*. Использованы: самки мыши линии C57BL/6J; защищенные от действия нуклеаз олигонуклеотидные производные длиной 13 и 20 нуклеотидов; стандартные методы количественного определения липопротеидов – ХС ЛПВП, ХС не-ЛПВП, общего холестерина (ХС) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) в сыворотке крови. АСО в комбинациях: 1) АСО к *apoB*, 2) АСО к *apoCIII*, 3) АСО к *apoB* и АСО к *PCSK9*, 4) АСО к *apoB*, АСО к *PCSK9* и АСО к *apoCIII*, 5) 3АСО к *apoB*, АСО к *PCSK9* и 2АСО к *apoCIII* (цифры – это кратность количества вводимого препарата), 6) АСО к *PCSK9* и (АСО к *apoCIII* – только в четвертое введение) вводили в хвостовую вену мышам по четыре раза. Вследствие трехкратного еженедельного введения в этих комбинациях уровень ХС не-ЛПВП относительно контроля был ниже на 25, 16, 35, 47, 60 и 7 % соответственно, а соотношение ХС ЛПВП/ХС не-ЛПВП выше в 1.8, 1.5, 1.9, 2.4, 3.1 и 1.24 раза. При последующем введении АСО с одновременным переходом на жировую диету через одну неделю в случае комбинаций 1–6 АСО уровень ХС не-ЛПВП был на 28, 2, 28, 70, 33 и 49 % ниже, чем в контроле, а соотношение ХС ЛПВП/ХС не-ЛПВП лучше в 1.5, 1.1, 2, 3.7, 1.9 и 2 раза соответственно. Концентрация АЛТ при всех комбинациях АСО оставалась в пределах уровня у контрольных животных, что указывает на отсутствие гепатотоксического эффекта. Для наибольшей эффективности антисмысловых олигонуклеотидных производных в комбинациях важно учитывать необходимость подбора концентраций, в том числе и в сочетаниях, а также порядка и периодов введения. Впервые предлагается временной комбинационно-концентрационный антисмысловый подход.

Ключевые слова: антисмысловые олигонуклеотидные производные; регуляция липидного обмена.

**Для цитирования:** Ошевский С.И., Рагино Ю.И., Каштанова Е.В., Полонская Я.В., Стахнева Е.М., Николин В.П., Попова Н.А., Колчанов Н.А., Воевода М.И. Изменения липидного обмена мыши при одновременном воздействии антисмысловыми олигонуклеотидными производными к мРНК генов *apoB*, *PCSK9* и *apoCIII*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(8):1020-1025. DOI 10.18699/VJ19.579

## Changes induced in mouse lipid metabolism by simultaneous impact of antisense oligonucleotide derivatives to *apoB*, *PCSK9*, and *apoCIII* mRNAs

S.I. Oshevski<sup>1</sup>✉, Y.I. Ragino<sup>1</sup>, E.V. Kashtanova<sup>1</sup>, Y.V. Polonskaya<sup>1</sup>, E.M. Stakhneva<sup>1</sup>, V.P. Nikolin<sup>1</sup>, N.A. Popova<sup>1,2</sup>, N.A. Kolchanov<sup>1</sup>, M.I. Voevoda<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: oshevski@bionet.nsc.ru

Development of new drugs able to decrease the level of “bad” cholesterol, in particular, based on antisense oligonucleotide derivatives (ASOs), remains relevant for the patients with familial hypercholesterolemia and/or intolerant to statins. The goal of the work was to assess the changes in the lipid metabolism caused by variants of joint impact of the ASOs targeted to the mRNAs of its key genes: *apoB*, *PCSK9*, and *apoCIII*. Female C57BL/6J mice; nuclease-protected 13- and 20-nucleotide ASOs, and standard protocols for quantification of lipoproteins (HDL CHL, non-HDL CHL, and total CHL) and ALT in the blood serum were used in the work. The following combi-

nations of ASOs were four times injected to the mouse caudal vein: 1) ASO to apoB, 2) ASO to apoCIII, 3) ASO to apoB and ASO to PCSK9, 4) ASO to apoB, ASO to PCSK9, and ASO to apoCIII, 5) ASO to apoB (three doses), ASO to PCSK9, and ASO to apoCIII (two doses), 6) ASO to PCSK9 and (ASO to apoCIII – only in the fourth administration). Triple weekly administration of these ASO combinations resulted in a decrease in non-HDL CHL by 25, 16, 35, 47, 60, and 7 %, respectively, as compared with the control and 1.8-, 1.5-, 1.9-, 2.4-, 3.1, and 1.24-fold higher HDL CHL/non-HDL CHL ratio. The subsequent ASO injection with concurrent switching to a high-fat diet after 1 week resulted in a decrease in the non-HDL CHL by 28, 2, 28, 70, 33, and 49 % for ASOs (1–6), respectively, as compared with the control; the HDL CHL/non-HDL CHL ratio was 1.5-, 1.1-, 2-, 3.7-, 1.9-, and 2-fold better. The ALT concentration for all ASO combinations remained within the norm for the control animals, demonstrating the absence of any hepatotoxic effect. The best efficiency of ASOs requires selection of concentrations for single ASOs and their combinations as well as of the order and timing of administration. Thus, a new antisense approach is proposed.

Key words: antisense oligonucleotide derivatives; lipid metabolism regulation.

**For citation:** Oshevski S.I., Ragino Y.I., Kashtanova E.V., Polonskaya Y.V., Stakhneva E.M., Nikolin V.P., Popova N.A., Kolchanov N.A., Voevoda M.I. Changes induced in mouse lipid metabolism by simultaneous impact of antisense oligonucleotide derivatives to *apoB*, *PCSK9*, and *apoCIII* mRNAs. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(8):1020-1025. DOI 10.18699/VJ19.579 (in Russian)

## Введение

Дислипидемия – значимый фактор развития раннего атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний, поэтому снижение уровня холестерина липопротеидов невысокой плотности (ХС не-ЛПВП) во многих случаях представляется важным для предотвращения этих болезней. В качестве профилактического средства хорошо зарекомендовали себя статины. Однако для пациентов с наследственной гиперхолестеринемией и/или не переносящих статины (Visser et al., 2012) существует потребность в дополнительных или альтернативных стратегиях эффективного снижения ХС не-ЛПВП. Такой стратегией в последние годы становится терапия антисмысловыми олигонуклеотидными производными (АСО), базирующаяся на антисмысловом подходе (Antisense Drug Technology..., 2008), когда вводимое олигонуклеотидное производное комплементарно связывается с мРНК или пре-мРНК значимого для липидного обмена белка и, таким образом, блокирует ее трансляцию, т.е. в итоге снижает концентрацию данного белка в клетке.

К 2018 г. Food and Drug Administration (FDA, США) допустило на рынок только один препарат на основе антисмысловых олигонуклеотидных производных, предназначенный для лечения дислипидемии. KYNAMRO (мипомерсен) предназначен для лечения гомозиготной наследственной гиперхолестеринемии. Он снижает уровень апоВ в плазме и уровень ХС ЛПНП в дозозависимой и экспозиционной манере (Geary et al., 2015), но имеет существенные побочные эффекты (Panta et al., 2015). Другие препараты: IONIS-APOCIII<sub>Rx</sub> (volanesorsen) – для лечения наследственной хиломикронемии и семейной частичной липодистрофии – прошел третью стадию клинических испытаний, но не был допущен FDA на рынок в 2018 г.; GalNAc-конъюгированные IONIS-APO(a)-LR<sub>x</sub> – для снижения уровня липопротеина (a) и IONIS-ANGPTL3-LR<sub>x</sub> – для преодоления смешанной дислипидемии – на второй стадии клинических испытаний (Hegele et al., 2019). Все эти подходы относятся к монотерапии. По-видимому, монотерапия вообще не может быть достаточно эффективной без побочных эффектов. Очевидно, что любое резкое изменение в концентрации (активности) одного из компонентов системы приводит к неоднозначным последствиям. Недавно нами было сформулировано

представление, что комплексное воздействие может быть эффективнее, так как система регуляции липидного обмена сложна и ее компоненты – это взаимосвязанные участники. Множественное, менее агрессивное воздействие АСО на ряд участников системы, возможное в разной степени, а, может быть, и разнонаправленное, представляется перспективным (Ошевский и др., 2015). Была показана принципиальная возможность влияния на липидный обмен сразу несколькими АСО (Ошевский и др., 2015). При воздействии АСО к трем мРНК важнейших генов липидного обмена, непосредственно связанных согласно генным сетям, – *apoB*, *PCSK9* и *apoCIII* – наибольший эффект снижения уровня ХС ЛПНП и наилучшее соотношение ХС ЛПВП/ХС ЛПНП достигалось при одновременном воздействии тремя АСО. Максимальную эффективность действия АСО в комбинациях наблюдали при индукции жировой диеты.

В настоящей работе задействованы ранее использованные варианты и добавлены: АСО к апоСIII как самостоятельный реагент, набор трех АСО в большей концентрации двух из них и комбинированное сочетание АСО к PCSK9 с АСО к апоСIII (комбинация 6). Такое расширенное воздействие развивает стратегию антисмыслового подхода. Фактически впервые предлагается временной комбинационно-концентрационный подход.

Антисмысловые олигонуклеотидные производные, использованные в работе, относятся к Гэпмерам (Garmers). Это олигонуклеотидные производные, имеющие на 5'- и 3'-концах короткие фрагменты олигомера – крылья (wings), отличные по химической природе от центральной части Гэпмера. Крылья придают Гэпмеру дополнительные свойства, например большую устойчивость к нуклеазам и т.д. Олигонуклеотидные производные длиной 13 и 20 нуклеотидов, защищенные от действия нуклеаз наличием межнуклеотидных фосфоротиоатных связей и блоками LNA-нуклеотидов (locked nucleic acids) на 5'- и 3'-концах (Antisense Drug Technology..., 2008), предложены нами ранее (Ошевский и др., 2015). Они представлены в таблице, где приведены также данные о специфичности действия их аналогов, имеющих такие же нуклеотидные адреса. Химическое отличие АСО в нашей работе от используемых другими авторами – это межнуклеотидные фосфатные остатки в LNA-блоках вместо фосфотио-

### Свойства использованных АСО

Структура АСО (LNA-нуклеотиды подчеркнуты)	Действие на мышь аналогов – полных фосфоротиоатов (лит. источник)	Вводимое кол-во, мг (в работе)
5'- <u>GC</u> р <sub>5</sub> Ар <sub>5</sub> Тр <sub>5</sub> Тр <sub>5</sub> Гр <sub>5</sub> Гр <sub>5</sub> Тр <sub>5</sub> Ар <sub>5</sub> Тр <sub>5</sub> <u>TCA</u> мишень: мРНК апоВ	Снижает уровень ХС, ХС ЛПНП (на 80 %) при снижении ХС ЛПВП (на 50 %) (Straarup et al., 2010)	0.04
5'- <u>GT</u> р <sub>5</sub> Ср <sub>5</sub> Тр <sub>5</sub> Гр <sub>5</sub> Тр <sub>5</sub> Гр <sub>5</sub> Гр <sub>5</sub> Ар <sub>5</sub> Ар <sub>5</sub> <u>GCG</u> мишень: мРНК PCSK9	Снижает уровень мРНК PCSK9, что приводит к увеличению содержания LDLR в 2–3 раза (Gupta et al., 2010)	0.08
5'- <u>GA</u> р <sub>5</sub> Гр <sub>5</sub> Ар <sub>5</sub> Ар <sub>5</sub> Ср <sub>5</sub> Ар <sub>5</sub> Тр <sub>5</sub> Ар <sub>5</sub> Ср <sub>5</sub> Тр <sub>5</sub> <u>TT</u> р <sub>5</sub> Ср <sub>5</sub> Ср <sub>5</sub> Ср <sub>5</sub> Ср <sub>5</sub> <u>TTA</u> мишень: мРНК апоСIII, курсивом обозначена сделанная замена: Т (у крысы) заменено на С	Должен снижать уровень апоСIII и ТГ, его аналог снижал в два раза уровень апоСIII и на 40–60 % уровень ТГ в крови крыс на 40-й день воздействия (Holmberg et al., 2011)	0.1

атных. Эта особенность может быть весьма полезна, так как для АСО с межнуклеотидными фосфоротиоатными остатками в LNA-блоках, особенно с последовательностями ТСС и ТГС, показана гепатотоксичность (Burdick et al., 2014). Кроме того, олигонуклеотидные производные имеют структуры, исключающие значимые комплементарные взаимодействия их друг с другом при совместном использовании, которое, очевидно, приводило бы к снижению их эффективности. Мы исследовали последовательные изменения ХС ЛПВП, ХС не-ЛПВП, ХС и АЛТ в течение длительного периода у каждого животного индивидуально, в том числе и в контроле. Ситуация соответствует понятию «персонализированная медицина». Исследование воздействия АСО на одну пациентку было недавно опубликовано (Van Poelgeest et al., 2013).

Цель нашей работы – на примере липидного обмена мыши показать возможность нового подхода в антисмысловой технологии – воздействовать одновременно несколькими антисмысловыми олигонуклеотидными производными, направленными на мРНК взаимосвязанных генов, используя производные в различных сочетаниях, изменяя сочетания производных в разные временные периоды и варьируя концентрации производных в сочетаниях.

### Материалы и методы

Антисмысловые олигонуклеотидные производные синтезированы фирмой «Биосинтез» (Новосибирск, Россия), выделены методом обращенно-фазовой хроматографии и охарактеризованы с помощью электрофореза в денатурирующем ПААГ. Использовали самок мыши линии С57BL/6J в возрасте 20 дней, имеющих вес 20–21 г, выращенных в виварии конвенциональных животных ИЦиГ СО РАН. Эксперименты выполняли в условиях виварии, как в работе (Ошевский и др., 2015), при температуре 22–24 °С и влажности около 65 %. Рацион составлял корм «Чара» SPF-категории (ЗАО «Ассортимент-Агро», Россия). Для индукции жировой диеты в корм добавляли жир до общего содержания 17 %.

АСО вводили в физиологическом растворе в объеме 200 мкл в хвостовую вену, кровь забирали из ретроорбитального синуса в количестве 250–300 мкл. Перед забороном крови мышей лишали пищи на 16 ч. Сыворотку крови получали стандартным методом: через 1.5 ч при комнатной температуре после свертывания крови сгусток аккуратно отделяли носиком автоматической пипетки от стенок

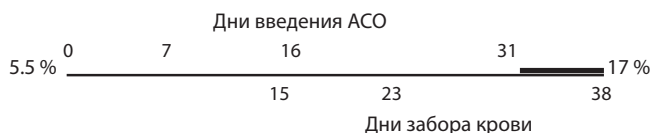
пробирки и центрифугировали содержимое при 1500 g (4000 об./мин) при комнатной температуре на микроцентрифуге Eppendorf в течение 4 мин. Сыворотку аккуратно собирали автоматической пипеткой и хранили замороженной при –70 °С. Во всех образцах сыворотки определяли ХС, холестерин липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП), ХС не-ЛПВП и уровень АЛТ энзиматическими методами с использованием стандартных реактивов Biocon Fluitest (Германия) на биохимическом анализаторе «Фотометр 5010+». В экспериментах использовали по одному животному, в контрольном эксперименте – четыре животных, которым вводили физиологический раствор.

### Результаты и обсуждение

Общая схема эксперимента представлена на рис. 1. АСО вводили растворенными в физиологическом растворе в комбинациях: 1) АСО к апоВ, 2) АСО к апоСIII, 3) АСО к апоВ и АСО к PCSK9, 4) АСО к апоВ, АСО к PCSK9 и АСО к апоСIII, 5) 3АСО к апоВ, АСО к PCSK9 и 2АСО к апоСIII, 6) АСО к PCSK9 и (АСО к апоСIII)<sup>1</sup> в количестве, указанном в таблице, или кратно.

Результаты анализа сыворотки крови приведены на рис. 2. В контрольном эксперименте показаны средние значения. Стандартные отклонения значений концентрации ХС не-ЛПВП от средних на 15-, 23- и 38-й дни составляли 5.7, 1 и 4 соответственно. У опытных мышей на 15-й день при воздействии каждым из АСО (комбинации 1, 2 и 6) уровни ХС не-ЛПВП были существенно выше уровня контрольных мышей. По-видимому, воздействие после двух введений АСО оказалось недостаточным для снижения ХС не-ЛПВП, что могло привести к ответной реакции с повышением уровня ХС не-ЛПВП, т.е. было преодолено с ответным превышением. При более комплексном воздействии: двумя (комбинация 3), тремя (комбинация 4) и тремя с увеличенной концентрацией компонентов (комбинация 5) АСО наблюдается значимое результирующее снижение уровней ХС не-ЛПВП, что коррелирует с полученными соотношениями ХС ЛПВП/ХС не-ЛПВП для комбинаций АСО на 15-й день (рис. 3). При дальнейшем введении АСО к 23-му дню воздействие во всех комбинациях АСО оказалось эффективным: снижение ХС не-ЛПВП составляло относительно контроля 25, 16, 35, 47, 60 и 7 % соответственно.

<sup>1</sup> Три раза вводили АСО к PCSK9, а в четвертый раз на 31-й день – АСО к PCSK9 и АСО к апоСIII.



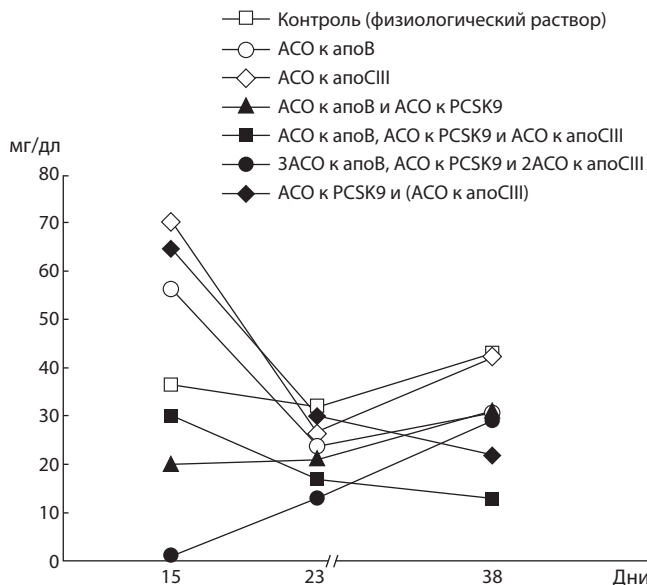
**Рис. 1.** Общая схема введения АСО, забора крови и диеты.

Линией обозначено время, ее толщина отражает содержание жира в диете животных (%).

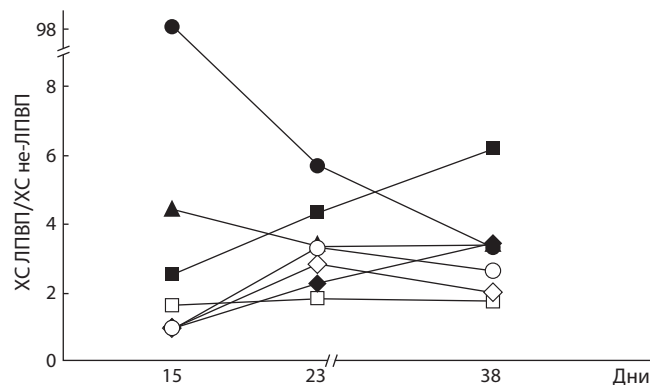
Согласно рис. 2, снижение ХС не-ЛПВП больше в комбинации 3 – двух производных АСО к апоВ и АСО к PCSK9, чем при действии только АСО к апоВ, АСО к апоСIII или только АСО – к PCSK9. Снижение еще больше в полной комбинации АСО (47 %) и достигает величины 60 % в полной комбинации с увеличенными концентрациями АСО. При этом наблюдается и улучшение соотношения ХС ЛПВП/ХС не-ЛПВП относительно контроля: в 1.8, 1.5, 1.9, 2.4, 3.1 и 1.24 раза, коррелирующее с изменениями ХС не-ЛПВП при действии АСО в соответствующих сочетаниях (см. рис. 3). Таким образом, на 23-й день еженедельного воздействия АСО на мышечной при обычной диете существенно снижается уровень ХС не-ЛПВП и улучшается соотношение ХС ЛПВП/ХС не-ЛПВП, особенно при действии АСО в максимальной комбинации и в максимальной комбинации с увеличенной концентрацией компонентов.

Далее систему липидного обмена стимулировали жировой диетой, увеличив содержание жира в три раза – от 5.5 до 17 % – непосредственно после введения следующей дозы АСО (31-й день). Результаты анализов сывороток на рис. 2. Уровень ХС не-ЛПВП в контроле повысился в 1.34 раза и является самым высоким; на 2 % ниже уровень в случае АСО к апоСIII (повысился на 55 %). В случае АСО к апоВ и комбинации АСО к апоВ и PCSK9 уровни ХС не-ЛПВП равны и на 28 % ниже, чем в контроле (повысились на 29 и 47 % соответственно). В случае комбинации 6, когда к АСО к PCSK9 добавилось АСО к апоСIII, уровень ХС не-ЛПВП существенно понизился – в 1.36 раза, и он был на 49 % ниже, чем в контроле. В наиболее полной комбинации АСО наблюдается снижение уровня ХС не-ЛПВП в 1.3 раза, что на 70 % меньше, чем в контроле. При этом, как видно из рис. 3, соотношение ХС ЛПВП/ХС не-ЛПВП относительно контроля в комбинациях 1, 2, 3, 4, 6 лучше в 1.5, 1.1, 2, 3.7, 2 раза соответственно. По сравнению с 23-м днем соотношение стало существенно выше только при действии комбинации 6 и наиболее полной комбинации АСО в 1.6 и 1.5 раза соответственно, несмотря на жировую диету.

Важно, что при жировой диете максимально низкий уровень ХС не-ЛПВП по сравнению с контролем с разницей 70 % и наилучшее соотношение ХС ЛПВП/ХС не-ЛПВП – 6.4 наблюдаются именно при наиболее полной комбинации АСО. Существенным является результат изменения уровня ХС не-ЛПВП при действии АСО в максимальной комбинации с увеличенной концентрацией компонентов (комбинация 5). На 15-й день он максимально низкий, к 23-му дню возрастает в 13 раз, оставаясь при этом самым низким (минус 60 % относительно контроля) и далее при



**Рис. 2.** Уровень концентрации ХС не-ЛПВП в сыворотке крови мышечной линии C57BL/6J.



**Рис. 3.** Соотношение ХС ЛПВП/ХС не-ЛПВП в сыворотке крови мышечной линии C57BL/6J.

Обозначения см. на рис. 2.

индукции жировой диеты увеличивается еще в 2.2 раза, достигая уровня на 5 % меньше, чем в случае действия АСО к апоВ и комбинации АСО к апоВ и PCSK9. Эти изменения коррелируют с уменьшением соотношения ХС ЛПВП/ХС не-ЛПВП от 98 до 5.8 и 3.3 к 38-му дню для комбинации 5. К 38-му дню соотношение становится равным соотношению для комбинации 3 АСО к апоВ и PCSK9 и близко соотношению для комбинации 1 АСО к апоВ, равному 2.6. Таким образом, на 15-й день уровень ХС не-ЛПВП чрезвычайно низкий и постепенно повышается, несмотря на действие трех АСО, два из которых в высокой концентрации. По-видимому, столь резкое снижение уровня ХС не-ЛПВП к 15-му дню приводит к активной ответной реакции организма мыши, направленной на преодоление эффекта препаратов АСО в высокой концентрации, что дополнительно стимулируется жировой диетой и завершается достижением приемлемого уровня. Следует отметить, что при максимальной нагрузке АСО концентрация АЛТ в 15-, 23- и 38-й дни составляла

35, 40, 40 ед./л соответственно, т.е. фактически оставалась без изменений и так же, как у контрольных мышей, была около 40 ед./л. И использованные олигонуклеотидные производные обладают высокой стоимостью<sup>2</sup>. Учитывая невозможность получения на первом этапе статистических данных, в работе оценивали только существенные количественные различия. Важно, что мы исследовали последовательные изменения ХС не-ЛПВП в течение длительного периода индивидуально у каждого животного. При сравнении эффектов воздействия трех АСО в двух концентрационных сочетаниях и двух АСО в комбинации 6, а также полной картины наблюдаемых изменений уровней ХС не-ЛПВП во всех вариантах действия АСО в 15-, 23- и 38-й дни можно заключить, что для достижения наибольшей эффективности антисмысловых олигонуклеотидных производных в комбинациях важно учитывать необходимость подбора концентраций, в том числе и в сочетаниях, и порядок и периоды введения АСО.

П. Замечник в 2007 г. впервые предложил одновременно использовать три фосфоротиоатные олигонуклеотидные производные для подавления бактериальной активности *Mycobacterium tuberculosis*, ингибируя три микобил-трансферазы (Harth et al., 2007). В 2012 г. группа исследователей воздействовала 10 АСО для коррекции сплайсинга РНК дистрофина (Aoki et al., 2012). Работа развивается и в настоящее время, показано действие коктейля конъюгатов морфолиновых олигонуклеотидных производных с пептидом на изменение сплайсинга экзонов 6 и 8 РНК дистрофина сердечной мышцы на модели дистрофии Дюшена собак (Echigoaya et al., 2017). В 2015 г. появился очень интересный вариант воздействия на два гена мыши, *anoB* и *anoCIII*, полинуклеотидным производным, состоящим из двух LNA-содержащих Гэпмеров, соединенных между собой четырехнуклеотидным природным линкером, который гидролизует внутри клетки, высвобождая два коротких функционирующих в качестве антисмысловых олигонуклеотидных производных агента. R.R. Subramanian с коллегами (2015) показали высокую эффективность конструкции, они считают, что ее использование способствует уменьшению количества побочных эффектов от АСО к РНК апоСIII.

Таким образом, наблюдается тенденция к развитию антисмысловой технологии в сторону воздействия не одним АСО. В приведенных выше вариантах не рассматривается значение влияния в комбинации концентрации каждого АСО, нацеленного на РНК каждого из генов, или их последовательности воздействия. Именно в случае воздействия на целую систему организма, а не на один процесс, и важны рассматриваемые в работе концентрационные зависимости в сочетаниях АСО и возможная последовательность их действия.

## Заключение

Таким образом, впервые предлагается временной комбинационно-концентрационный подход антисмысловой

технологии, открывающий новые перспективы создания терапевтических инструментов воздействия на системы организма. Подход согласуется с концепцией персонализированной медицины, так как допускает гибкость и вариабельность, учитывающие особенности организма пациента, в результате чего можно ожидать большей эффективности воздействия АСО, по сравнению с монотерапией, и снижения острых проявлений побочных эффектов.

## Список литературы / References

- Ошевский С.И., Рагино Ю.И., Каштанова Е.В., Полонская Я.В., Стахнева Е.М., Николин В.П., Попова Н.А., Кораблев А.Н., Колчанов Н.А., Воевода М.И. Одновременное воздействие несколькими антисмысловыми олигонуклеотидными производными, его эффективность на примере липидного обмена мыши. Атеросклероз. 2015;11(3):72-78.  
[Oshevski S.I., Ragino Y.I., Kashtanova E.V., Polonskaya Y.V., Stakhneva E.M., Nikolin V.P., Popova N.A., Korablev A.N., Kolchanov N.A., Voevoda M.I. The efficacy of simultaneous action of several antisense oligonucleotide derivatives by the example of lipid metabolism in mice. Atherosclerosis = Atherosclerosis. 2015;11(3):72-78. (in Russian)]
- Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications. Second Edition. Crooke S.T. (Ed.). CRC Press, 2008.
- Aoki Y., Yokota T., Nagata T., Nakamura A., Tanihata J., Saito T., Duguez S.M., Nagaraju K., Hoffman E.P., Partridge T., Takeda S. Body-wide skipping of exons 45-55 in dystrophic mdx52 mice by systemic antisense delivery. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012;109(34):13763-13768. DOI 10.1073/pnas.1204638109.
- Burdick A.D., Sciabola S., Mantena S.R., Hollingshead B.D., Stanton R., Warneke J.A., Zeng M., Martsen E., Medvedev A., Makarov S.S., Reed L.A., Davis J.W. 2nd, Whiteley L.O. Sequence motifs associated with hepatotoxicity of locked nucleic acid–modified antisense oligonucleotides. Nucleic Acids Res. 2014;42(8):4882-4891. DOI 10.1093/nar/gku142.
- Echigoaya Y., Nakamura A., Nagata T., Urasawa N., Lim K.R.Q., Trieu N., Panesar D., Kuraoka M., Moulton H.M., Saito T., Aoki Y., Iversen P., Sazani P., Kole R., Maruyama R., Partridge T., Takeda S., Yokota T. Effects of systemic multiexon skipping with peptide-conjugated morpholinos in the heart of a dog model of Duchenne muscular dystrophy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017;114(16):4213-4218. DOI 10.1073/pnas.1613203114.
- Geary R.S., Baker B.F., Crooke S.T. Clinical and preclinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mipomersen (Kynamro®): a second-generation antisense oligonucleotide inhibitor of apolipoprotein B. J. Clin. Pharmacokin. 2015;54(2):133-146. DOI 10.1007/s40262-014-0224-4.
- Gupta N., Fisker N., Asselin M.C., Lindholm M., Rosenbohm C., Ørum H., Elmén J., Seidah N.G., Straarup E.M. 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.
- Harth G., Zamecnik P.C., Tabatadze D., Pierson K., Horwitz M.A. Hairpin extensions enhance the efficacy of mycolyl transferase-specific antisense oligonucleotides targeting *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007;104(17):7199-7204. DOI 10.1073/pnas.0701725104.
- Hegele R.A., Tsimikas S. Lipid-lowering agents. Circ. Res. 2019;124(3):386-404. DOI 10.1161/CIRCRESAHA.118.313171.
- Holmberg R., Refai E., Höög A., Crooke R.M., Graham M., Olivecrona G., Berggren P.O., Juntti-Berggren L. Lowering apolipoprotein CIII delays onset of type 1 diabetes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011;108(26):10685-10689. DOI 10.1073/pnas.1019553108.
- Panta R., Dahal K., Kunwar S. Efficacy and safety of mipomersen in treatment of dyslipidemia: A meta-analysis of randomized control-

<sup>2</sup> В настоящее время рано планировать применение комбинаций АСО к лечению дислипидемии у человека в силу большой стоимости производных использованного типа. Но по мере увеличения потребности и, как следствие, увеличения масштабов синтеза, стоимость АСО, как показываает практика, существенно снижается.

- led trials. *J. Clin. Lipidol.* 2015;(2):217-225. DOI 10.1016/j.jacl.2014.12.006.
- Straarup E.M., Fisker N., Hedtjærn M., Lindholm M.W., Rosenbohm C., Aarup V., Hansen H.F., Ørum H., Hansen J.B., Koch T. Short locked nucleic acid antisense oligonucleotides potently reduce apolipoprotein B mRNA and serum cholesterol in mice and non-human primates. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(20):7100-7111. DOI 10.1093/nar/gkq457.
- Subramanian R.R., Wysk M.A., Ogilvie K.M., Bhat A., Kuang B., Rockel T.D., Weber M., Uhlmann E., Krieg A.M. Enhancing antisense efficacy with multimers and multi-targeting oligonucleotides (MTOs) using cleavable linkers. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(19):9123-9132. DOI 10.1093/nar/gkv992.
- van Poelgeest E.P., Swart R.M., Betjes M.G., Moerland M., Weening J.J., Tessier Y., Hodges M.R., Levin A.A., Burggraaf J. Acute kidney injury during therapy with an antisense oligonucleotide directed against PCSK9. *Am. J. Kidney Dis.* 2013;62(4):796-800. DOI 10.1053/j.ajkd.2013.02.359.
- Visser M.E., Witztum J.L., Stroes E.S., Kastelein J.J. Antisense oligonucleotides for the treatment of dyslipidaemia. *Eur. Heart J.* 2012; 33(12):1451-1458. DOI 10.1093/eurheartj/ehs084.

---

#### ORCID ID

M.I. Voevoda orcid.org/0000-0001-9425-413X

**Благодарности.** Работа выполнена по бюджетному проекту ИЦиГ СО РАН № 0324-2019-0041 и поддержана грантом, полученным Новосибирским национальным исследовательским государственным университетом в рамках Проекта 5-100. Авторы выражают глубокую признательность В.И. Каледину и В.А. Напримерову за содействие в работе.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 09.11.2017. После доработки 04.10.2019. Принята к публикации 04.10.2019.