

**ОДНОВРЕМЕННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НЕСКОЛЬКИМИ АНТИСМЫСЛОВЫМИ  
ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ, ЕГО ЭФФЕКТИВНОСТЬ  
НА ПРИМЕРЕ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА МЫШИ****С.И. Ошевский<sup>1</sup>, Ю.И. Рагино<sup>2</sup>, Е.В. Каштанова<sup>2</sup>, Я.В. Полонская<sup>2</sup>, Е.М. Стахнева<sup>2</sup>,  
В.П. Николин<sup>1</sup>, Н.А. Попова<sup>1</sup>, А.Н. Кораблев<sup>3</sup>, Н.А. Колчанов<sup>1</sup>, М.И. Воевода<sup>1,2,3</sup>**<sup>1</sup>*ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» СО РАН  
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10*<sup>2</sup>*ФГБНУ «НИИ терапии и профилактической медицины»  
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1*<sup>3</sup>*Новосибирский национальный исследовательский государственный университет  
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2*

Цель исследования: на примере мыши показать возможность регуляции липидного обмена одновременным воздействием несколькими антисмысловыми олигонуклеотидными производными (АСО), адресованными на мРНК близко взаимосвязанных и задействованных в регуляции липидного обмена белков. Материал и методы: самки мышей линии C57BL/6J, 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; стандартные методы количественного определения аполипопротеидов: апоВ и липопротеидов: холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП), холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП), общего холестерина (ХС), триглицеридов (ТГ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) в сыворотке крови. Результаты: растворенные в физиологическом растворе АСО в комбинациях: (1) АСО к апоВ, (2) АСО к апоВ и АСО к PCSK9, (3) АСО к апоВ, АСО к PCSK9 и АСО к апоСIII вводили в хвостовую вену мышам линии C57BL/6J по четыре раза. После трехкратного еженедельного введения АСО в комбинации (3) уровень ХС ЛПНП относительно контроля снижался на 25 % и на 42 % улучшалось соотношение ХС ЛПВП/ХС ЛПНП. При последующем введении АСО с одновременным переходом на жировую диету, через неделю в случае комбинаций (2) и (3) уровень ХС ЛПНП был в 1,5 и 3,5 раза ниже, чем в контроле, а соотношение ХС ЛПВП /ХС ЛПНП лучше в 2 и 5 раз соответственно. Одновременно в случае комбинаций (2) и (3) наблюдалось существенное снижение концентрации ТГ, которое достигало почти двукратного в комбинации (3). Данные эффекты проявляются при трехкратном увеличении содержания жира в рационе животных.

**Ошевский Сергей Иванович** – канд. хим. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики человека, e-mail: oshevski@bionet.nsc.ru

**Рагино Юлия Игоревна** – д-р мед. наук, проф., зав. лабораторией клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, e-mail: ragino@mail.ru

**Каштанова Елена Владимировна** – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, e-mail: elekashtanova@yandex.ru

**Полонская Яна Владимировна** – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, e-mail: yana-polonskaya@yandex.ru

**Стахнева Екатерина Михайловна** – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, e-mail: stahneva@yandex.ru

**Николин Валерий Петрович** – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории регуляции экспрессии генов, e-mail: nikolin@bionet.nsc.ru

**Попова Нэлли Александровна** – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории регуляции экспрессии генов, e-mail: nelly@bionet.nsc.ru

**Кораблев Алексей Николаевич** – студент факультета естественных наук, e-mail: korablevalexeyn@gmail.com

**Колчанов Николай Александрович** – д-р биол. наук, проф., академик РАН, директор, зав. отделом системной биологии, e-mail: kol@bionet.nsc.ru

**Воевода Михаил Иванович** – д-р мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, директор, зав. лабораторией молекулярной генетики человека, Лаборатория молекулярной эпидемиологии и биоинформатики, медицинский факультет НГУ, e-mail: mvoevoda@ya.ru

© 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., 2015

Концентрация АЛТ существенно снижалась при переходе от комбинации (1) к комбинации (3), т.е. при увеличении нагрузки на печень олигонуклеотидного материала, что указывает на отсутствие гепатотоксического эффекта. Заключение: на примере липидного обмена показана возможность эффективного регуляторного воздействия сразу несколькими бессмысленными олигонуклеотидными производными, адресованными на мРНК взаимосвязанных белков.

**Ключевые слова:** бессмысленные олигонуклеотидные производные, регуляция липидного обмена.

Одним из основных факторов развития раннего атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний является дислипидемия, поэтому снижение уровня холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП) во многих случаях представляется важным инструментом предотвращения этих болезней. К сожалению, ни монотерапия статинами, ни комбинаторная терапия статинами с добавлением снижающих уровень липидов соединениями не приводят к достижению целевых уровней ХС ЛПНП у заметной части пациентов, особенно у больных с генетически опосредованными очень высокими базовыми уровнями ХС ЛПНП, т.е. с наследственной гиперхолестеринемией и/или переносящих статины [1]. Очевидна потребность в дополнительных или альтернативных стратегиях эффективного снижения ХС ЛПНП. Такой стратегией в последние годы становится антисенс-подход [2], 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. В настоящее время в работах на животных открываются новые бессмысленные олигонуклеотидные производные (АСО) и одновременно развиваются исследования, связанные с человеком, с ранее найденными эффективными АСО, оценивается роль воздействия АСО на снижение уровня атеросклероза. Ингибирование синтеза аполипопротеида В (апоВ) или пропротеин конвертазы субтилизин/кексин тип 9 (PCSK9) АСО рассматривается как новый, имеющий перспективу подход к снижению уровней ХС ЛПНП [1]. Действительно, АСО второй генерации мипомерсен проходит стадию испытаний на пациентах. Он существенно снижает уровень апоВ в плазме и уровень ХС ЛПНП в дозависимой и экспозиционной манере [3]. Однако препарат имеет и побочные эффекты, работы по исследованию его действия продолжаются [4, 5]. С родственными по первичной структуре мипомерсену АСО на дефицитных по рецептору ХС ЛПНП (LDLR), страдающих гиперхолестеринемией мышцах, показано уменьшение ХС ЛПНП

в плазме на 60–90 % при наблюдаемом уменьшении атеросклероза на 50–90 % [6]. Разрабатываются и новые по химической природе АСО. Так, 13-мер АСО с концевыми блоками LNA и промежуточными фосфоротиоатными звеньями ингибирует синтез апоВ100 [7], а другой 13-мер АСО такой же химической природы снижает уровень PCSK9 у мышей [8]. Интереснейшей мишенью для АСО является мРНК апоСIII, экспрессирующегося в печени и играющего центральную роль в регулировании триглицеридов плазмы. апоСIII участвует в прохождении пути от гиперхолестеринемии к атеросклерозу [9]. На животных моделях АСО уменьшал уровень апоСIII и, как следствие, триглицеридов в плазме на 40–60 % [10].

Следует отметить, что использование даже агрессивной терапии, например статиновой, не убирает атеросклеротические сердечно-сосудистые явления. По-видимому, монотерапия вообще не может быть эффективной без побочных эффектов, так как система регуляции липидного обмена сложна и ее компоненты – это взаимосвязанные участники. Очевидно, что любое резкое изменение в концентрации (активности) одного из компонентов системы может привести к неоднозначным последствиям. Множественное, менее агрессивное воздействие на ряд участников системы, возможное в разной степени, а может быть, и разнонаправленное, представляется перспективным.

На модельных мышках мы предлагаем проверить возможность одновременного воздействия АСО, блокирующих экспрессию некоторых белков, и оценить влияние этого воздействия на регуляцию липидного обмена.

Задача не имеет аналогов, так как структуры олигонуклеотидных производных должны исключать комплементационное взаимодействие их друг с другом, которое, очевидно, приводило бы к снижению их эффективности.

В антисенс-подходе самой большой сложностью является нахождение эффективного АСО, что во многом определяется местом его адресации на мРНК, т.е. его первичной структурой. Эти поиски очень затратны, а «находки» часто случайны. Поэтому, прежде всего,

Свойства, использованные АСО (LNA-нуклеотиды подчеркнуты)

Структура АСО	Действие на мышь (литературные данные)	Вводимое количество (в работе)
5'- <u>G</u> Cp <sub>s</sub> Ap <sub>s</sub> Tr <sub>s</sub> Tr <sub>s</sub> Gp <sub>s</sub> Gp <sub>s</sub> Tr <sub>s</sub> Ap <sub>s</sub> Tr <sub>s</sub> <u>TCA</u> мишень: мРНК apoB	Снижает уровень мРНК apoB, ХС, ЛПНП (на 80 %) при снижении ЛПВП (на 50 %) [7]	0,04 мг
5'- <u>G</u> Tr <sub>s</sub> Cp <sub>s</sub> Tr <sub>s</sub> Gp <sub>s</sub> Tr <sub>s</sub> Gp <sub>s</sub> Gp <sub>s</sub> Ap <sub>s</sub> Ap <sub>s</sub> <u>GCG</u> мишень: мРНК PCSK9	Снижает уровень мРНК PCSK9, что приводит к увеличению содержания LDLR в 2–3 раза [8]	0,08 мг
5'- <u>G</u> Ap <sub>s</sub> Gp <sub>s</sub> Ap <sub>s</sub> Ap <sub>s</sub> Cp <sub>s</sub> Ap <sub>s</sub> Tr <sub>s</sub> Ap <sub>s</sub> Cp <sub>s</sub> Tr <sub>s</sub> <u>TT</u> Tr <sub>s</sub> Cp <sub>s</sub> Cp <sub>s</sub> Cp <sub>s</sub> <u>TTA</u> мишень: мРНК apoСIII, наклонной буквой обозначена сделанная замена: Т (у крысы) заменено на С.	Должен снижать уровень apoСIII и ТГ, его аналог в два раза снижал уровень apoСIII и на 40–60 % уровень ТГ в крови крыс на 40 день воздействия [11]	0,1 мг

мы рассмотрели ряд производных, известных из литературы. Конечно, большое значение имеет и химическое строение АСО. Речь идет о двух АСО 13-мерах: фосфоротиоатах с концевыми LNA-нуклеотидами к мРНК apoB100 и PCSK9 [7, 8]. Сравнение первичных структур этих производных показало, что они могут быть использованы в антисенс-подходе одновременно. Третьим мы выбрали АСО к мРНК apoСIII – 20-мер, который эффективно ингибировал трансляцию мРНК apoСIII у крыс [11] и имел другое химическое строение. Его первичная структура была подкорректирована на один нуклеотид для полного соответствия адресации для мышши. Анализ первичных структур этих производных показал возможность их совместного использования. 20-мер был переконструирован в АСО, имеющий фосфоротиоатные связи и блоки LNA-нуклеотидов на концах и во внутренней части (таблица).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Антисмысловые олигонуклеотидные производные были синтезированы фирмой «Биосинтез» (г. Новосибирск), выделены методом обращенно-фазовой хроматографии и охарактеризованы методом электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле. Использовались самки мышши линии C57BL/6J в возрасте 20 дней, имеющие вес 20–21 г, выращенные в виварии конвенциональных животных ИЦиГ СО РАН. Их содержание и эксперименты выполнялись в виварии. АСО вводили в физиологическом растворе в объеме 200 мкл в хвостовую вену, кровь забирали из ретроорбитального синуса в количестве 250–300 мкл. Перед забором крови мышшей лишали пищи на 16 ч. Сыворотку крови получали стандартным методом. Во всех образцах сыворотки определяли общий холестерин (ХС), холестерин липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП), ХС ЛПНП, триглицериды

(ТГ) и уровень аланинаминотрансферазы (АЛТ) энзиматическими методами с использованием стандартных реактивов Biocon Fluitest (Германия) на биохимическом анализаторе «Фотометр 5010+». Уровень apoB измеряли иммунотурбидиметрическим методом с использованием реактивов DiaSys (Германия). В силу ограниченного количества дорогих АСО в экспериментах использовали по одному животному. В контрольном эксперименте – 4 животных, которым вводили физиологический раствор.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общая схема экспериментов представлена на рис. 1. АСО вводили растворенными в физиологическом растворе в комбинациях: (1) АСО к apoB, (2) АСО к apoB и АСО к PCSK9, (3) АСО к apoB, АСО к PCSK9 и АСО к apoСIII, каждого в количестве, указанном в таблице. После двух введений на 15-й день отбирали кровь и на 16-й день вновь вводили АСО. Результаты первого анализа сыворотки выявили отличия между опытной и контрольной группами животных в количестве apoB. Комбинации (1) – 0,9, (2) – 0,5, (3) – 0,3 мг/дл при среднем значении в контроле 3,4 мг/дл. Таким образом, наблюдалось существенное снижение количества apoB, эффект усиливался при переходе от одного к трем олигонуклеотидным производным. Остальные измеряемые параметры существенно не отличались, включая концентрации ХС ЛПНП. В этих экспериментах ТГ и АЛТ не определяли. Анализ сыворотки крови на 23-й день (рис. 2)

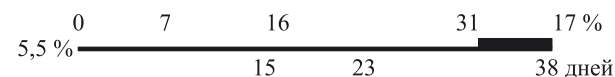
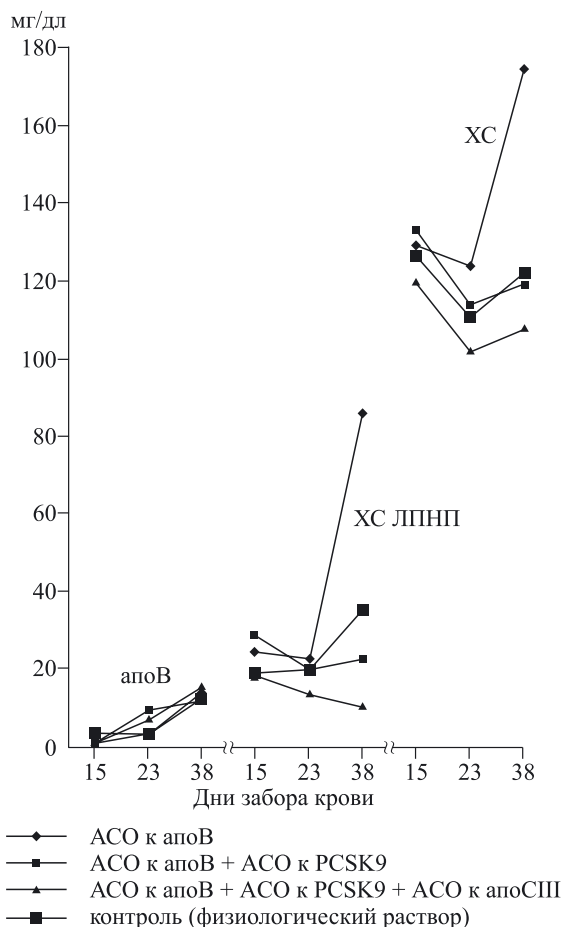
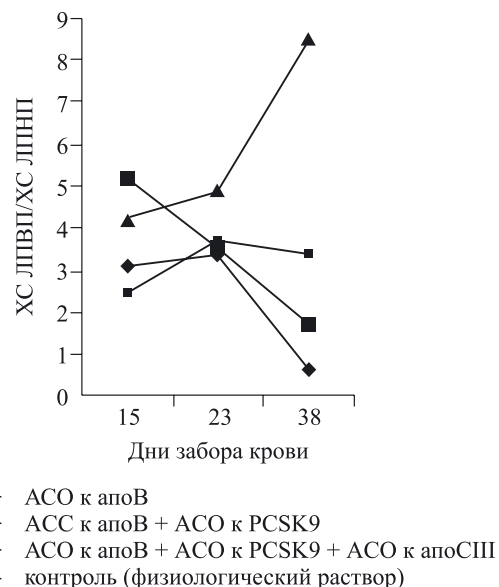


Рис. 1. Общая схема введения АСО, забора крови и диета. Линией обозначено время, кроме того, ее толщина отражает содержание жира в диете животных, количество жира указано в процентах. Сверху указаны дни введения АСО, внизу – дни забора крови



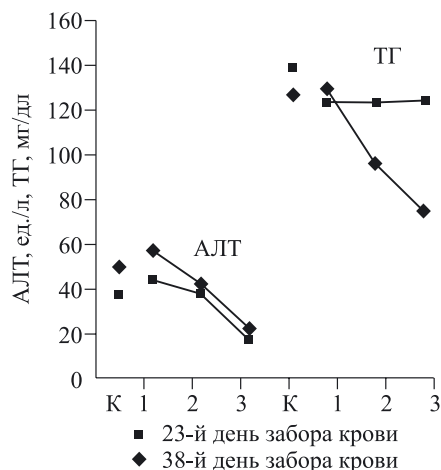
**Рис. 2.** Уровень концентрации в сыворотке крови мышей линии C57BL/6J apoB, XС ЛПНП и общего XС

показал увеличение apoB в 2 и 3 раза в случае комбинаций (3) и (2) соответственно. Следует отметить небольшое снижение XС ЛПНП в комбинации (3) и очень малое увеличение в комбинации (1) относительно контроля, коррелирующие со снижением и увеличением соответственно общего XС. При этом, как видно из рис. 3, наблюдалось улучшение соотношения XС ЛПВП / XС ЛПНП в комбинации (3). Количество ТГ не зависело от комбинации вводимых АСО (рис. 4) и было несколько ниже, чем в контроле. Следует отметить, что активность АЛТ снижалась от комбинации (1) к комбинации (3) и достигала двукратного уменьшения по сравнению с контролем, что указывает на отсутствие проявления гепатотоксичности у вводимых комбинаций АСО. Картина получилась довольно сложная и недостаточно выраженная. Поэтому, чтобы «проявить» наблюдаемые эффекты, мы стимулировали систему липидного обмена введением жировой диеты, увеличив содержание



**Рис. 3.** Соотношение XС ЛПВП / XС ЛПНП в сыворотке крови мышей линии C57BL/6J

жира в 3 раза – от 5,5 до 17 %, непосредственно после введения следующей дозы АСО (31-й день). Результаты анализов сывороток на седьмой день после последнего введения объединены с предыдущими анализами для каждого подопытного животного и представлены на рис. 2 – 4 в виде графиков. Видно (см. рис. 2), что уровень apoB повысился, особенно в контроле и комбинации (1), и все полученные значения близки. Для XС ЛПНП наблюдается почти 2-кратное увеличение в контроле и 4-кратное уве-



**Рис. 4.** Уровень концентрации в сыворотке крови мышей линии C57BL/6J АЛТ и ТГ.

1 – АСО к apoB; 2 – АСО к apo B + АСО к PCSK9; 3 – АСО к apo B + АСО к PCSK9 + АСО к apoCIII; К – контроль (физиологический раствор)



личение в комбинации (1). Контрольное увеличение представляется допустимым, а увеличение в комбинации (1), по-видимому, объясняется тем, что воздействия одного АСО недостаточно, чтобы блокировать образование ХС ЛПНП при увеличении содержания жира, и в этих условиях в результате преодоления эффекта АСО наблюдается еще большее образование ХС ЛПНП. В то же время в комбинации (2) уровень ХС ЛПНП в 1,5 раза ниже, а в комбинации (3) – в 3,5 раза ниже, чем в контроле, что указывает на снижение уровня ХС ЛПНП до величины 28 % относительно контроля. Похожие зависимости наблюдаются для изменений концентраций полного ХС, хотя в количественном отношении они гораздо менее выражены. Данные по соотношению ХС ЛПВП и ХС ЛПНП, представленные на рис. 3, также отражают выявленные тенденции. Видно, что соотношение «хорошего» и «плохого» холестерина улучшилось в два раза по сравнению с контролем при совместном действии АСО к апоВ и к PCSK9 (комбинация (2)) и в 5 раз при совместном действии АСО к апоВ, PCSK9 и апоСIII (комбинация (3)). Следует отметить, что данные эффекты значительны и проявляются при 3-кратном увеличении содержания жира в рационе животных. Можно сделать вывод, что именно использование не одного АСО, а комбинации различных АСО, направленных на мРНК функционально связанных генов, привело к сдерживанию увеличения и уменьшению концентрации ХС ЛПНП в сыворотке крови. Увеличение количества генов, трансляция мРНК которых подавлялась, привело к существенно значимому позитивному эффекту улучшения соотношения ХС ЛПВП / ХС ЛПНП. И этот эффект был максимален при применении АСО в комбинации трех производных, направленных на мРНК апоВ, PCSK9 и апоСIII. Одновременно наблюдалось существенное снижение концентрации ТГ (см. рис. 4) при комбинации (2), которое достигало почти 2-кратного при воздействии комбинации (3) АСО. Эти результаты хорошо коррелируют друг с другом и показывают, что АСО оказали воздействие на систему липидного обмена в целом, что ответ системы носил системный, комплексный характер. Наблюдалось изменение веса животных. Контрольные мыши за время эксперимента в среднем прибавили в весе 1 г, мыши, которым вводили олигонуклеотидные производные, прибавили в весе 2,7, 1,2 и 1,9 г при введении комбинаций (1), (2) и (3) соответственно. Здесь нет корреляции с данными по соотношению ХС ЛПВП / ХС ЛПНП (см. рис. 3), но можно предположить, что метаболические пути

перераспределили питательные вещества в направлении формирования жировых запасов.

Некоторые из полученных результатов не воспроизводят описанные в литературе эффекты. Наши результаты (23-й день) не воспроизводят снижение ХС ЛПНП на величину 80 % от контрольного при еженедельном введении АСО комбинации (1) в количестве 0,05 мг/мышь уже через две недели. Мы наблюдали слабо выраженное снижение ХС ЛПНП только в комбинации (3) и существенные различия в их концентрации при индукции жировой диеты. Реакция на жировую диету представляется вполне объяснимой, так как должен происходить синтез новых мРНК, подавление трансляции которых более выражено. Учитывая невозможность получить на первом этапе статистические данные, в работе оценивались только существенные количественные различия измеряемых параметров. Ситуация соответствует понятию «персонализированная медицина» (работа по исследованию воздействия АСО на одну пациентку опубликована [12]). Важно, что мы исследовали последовательные изменения апоВ, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, ХС, ТГ, АЛТ в течение длительного периода у индивидуальных животных. Непосредственно изменение LDLR в работе не определялось, но, если судить по результату (см. рис. 2, комбинация (2), жировая диета), оно проявилось уменьшением количества ХС ЛПНП. Очевидно, что именно добавление АСО к апоСIII к уже двум АСО к апоВ и PCSK9 привело к усилению эффекта действия антисмысловых олигонуклеотидных производных. Изменение уровня белка апоСIII не определяли. Мы использовали данные работы [10], где было показано существенное снижение уровня апоСIII и ТГ в крови крысы при действии близкородственного по первичной структуре АСО.

Важно, что концентрация АЛТ (см. рис. 4) существенно снижалась при переходе от комбинации (1) к комбинации (3), т.е. при увеличении нагрузки на печень олигонуклеотидного материала, что указывает на отсутствие гепатотоксического эффекта примененных олигонуклеотидных производных и на возможный гепатопротекторный эффект. Гепатотоксические эффекты для АСО к апоВ и АСО к PCSK9 не наблюдали и в работах [7, 8].

Конечно, огромное значение имел выбор сочетания генов, трансляция мРНК которых подавлялась. Чтобы планировать эксперименты более обоснованно, были рассмотрены генные сети аполипопротеидов и выбраны очень близкородственные именно с точки зрения генных сетей белки. Большое значение сыграли накопившиеся литературные данные, позволившие

выбрать АСО, которые не взаимодействуют друг с другом с образованием комплементарных комплексов, что не представлялось заранее возможным. Фактически, работа выполнена в то время, когда накопилось достаточное количество данных, создающих возможности для ее осуществления.

Хотя «в опыте» использовали по одному животному, картина полученных результатов, их общее соответствие позволяют представить сделанные выводы. К этому подталкивают потенциальные перспективы данного подхода – нового варианта антисенс-технологии. 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 показывает практика, существенно снижается. Таким образом, предлагаемый подход может послужить основой для создания перспективных терапевтических инструментов.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность Лактионову Павлу Петровичу за забор крови у мышей, а также Василию Ивановичу Каледину и Василию Анатольевичу Напримерову за доброжелательное содействие в работе.

Работа выполнена по бюджетному проекту ИЦиГ СО РАН № 58.1.1 и поддержана грантом, полученным Новосибирским национальным исследовательским государственным университетом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Visser M.E., Witztum J.L., Stroes E.S. et al. Antisense oligonucleotides for the treatment of dyslipidaemia // *Eur. Heart. J.* 2012. Vol. 33, N 12. P. 1451–1458.
2. *Antisense drug technology: principles, strategies, and applications*. Second Edition / Ed. S.T. Crooke. CRC Press, 2008.
3. 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 // *Clin. Pharmacokinet.* 2015. Vol. 54, N 2. P. 133–146.
4. Panta R., Dahal K., Kunwar S. Efficacy and safety of mipomersen in treatment of dyslipidemia: A meta-analysis of randomized controlled trials // *J. Clin. Lipidol.* 2015. Vol. 9, N 2. P. 217–225.
5. Gouni-Berthold I., Berthold H.K. Mipomersen and lomitapide: Two new drugs for the treatment of homozygous familial hypercholesterolemia // *Atheroscler. Suppl.* 2015. Vol. 18. P. 28–34.
6. Mullick A.E., Fu W., Graham M.J. et al. Antisense oligonucleotide reduction of apoB-ameliorated atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice // *J. Lipid Res.* 2011. Vol. 52, N 5. P. 885–896.
7. Straarup E.M., Fisker N., Hedtjærn 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. Res.* 2010. Vol. 38, N 20. P. 7100–7111.
8. Gupta N., Fisker N., Asselin M.C. et al. A locked nucleic acid antisense oligonucleotide (LNA) silences PCSK9 and enhances LDLR expression in vitro and in vivo // *PLoS One.* 2010. Vol. 5, N 5. e10682.
9. Kawakami A., Yoshida M. Apolipoprotein CIII links dyslipidemia with atherosclerosis // *J. Atheroscler. Thromb.* 2009. Vol. 16, N 1. P. 6–11.
10. Graham M.J., Lee R.G., Bell T.A. et al. Antisense oligonucleotide inhibition of apolipoprotein C-III reduces plasma triglycerides in rodents, nonhuman primates, and humans // *Circ. Res.* 2013. Vol. 112, N 11. P. 1479–1490.
11. Holmberg R., Refai E., Höög A. et al. Lowering apolipoprotein CIII delays onset of type 1 diabetes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2011. Vol. 108, N 26. P. 10685–10689.
12. Van Poelgeest E.P., Swart R.M., Betjes M.G. et al. Acute kidney injury during therapy with an antisense oligonucleotide directed against PCSK9 // *Am. J. Kidney Dis.* 2013. Vol. 62, N 4. P. 796–800

THE EFFICACY OF SIMULTANEOUS ACTION OF SEVERAL ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES BY THE EXAMPLE OF LIPID METABOLISM IN MICE

S.I. Oshevskii<sup>1</sup>, Yu.I. Ragino<sup>2</sup>, E.V. Kashtanova<sup>2</sup>, Ya.V. Polonskaya<sup>2</sup>, E.M. Stakhneva<sup>2</sup>, V.P. Nikolin<sup>1</sup>, N.A. Popova<sup>1</sup>, A.N. Korablev<sup>3</sup>, N.A. Kolchanov<sup>1</sup>, M.I. Voevoda<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of SB RAS  
630090 Novosibirsk, Akademik Lavrent'ev av., 10

<sup>2</sup>FSBSI «Institute of Internal and Preventive Medicine»  
630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1

<sup>3</sup>Novosibirsk State University  
630090, Novosibirsk, Pirogov str., 2

Motivation and Aim: Demonstration of the possibility of lipid metabolism regulation by joint action of several antisense oligonucleotide derivatives (ASOs) targeted to mRNAs of closely associated proteins involved in lipid metabolism. Material and Methods: Female mice of the C57BL/6J strain; 13- and 20-mer oligonucleotide derivatives (ASOs) protected from nucleases by the presence of inter-nucleotide thiophosphate bonds and locked nucleic acid (LNA) fragments at their 5'- and 3'- ends; conventional methods of assaying blood serum ALT, total cholesterol, TG, apolipoprotein apoB and lipoproteins: LDL-C, HDL-C. Results: Solutions of ASOs in isotonic solution were prepared in combinations: (1) anti-apoB; (2) anti-apoB + anti-PCSK9; (3) anti-apoB + anti-PCSK9 + anti-apoCIII. Four injections to the tail veins of C57BL/6J mice were done. After three injections of combination (3), done at weekly intervals, the LDL-C level decreased by 25 % with reference to the control, and the HDL-C/LDL-C ratio improved by 42 %. After subsequent injection of the ASOs accompanied by change to high-fat diet, mice exposed to combinations (2) and (3) showed lower LDL-C levels, by factors of 1.5 and 3.5 with reference to the control, and their HDL-C/LDL-C ratios were better two- and fivefold, respectively. In cases of combinations (2) and (3), a significant decrease in TG concentration was recorded, twofold in case of (3). These effects were observed at threefold fat content in the diet. The ALT level decreased significantly with transition from combination (1) to (3), i.e., when the liver experienced heavier load of oligonucleotide matter, which indicates to the absence of hepatotoxicity. Conclusions: The possibility of efficient regulatory joint action of several ASOs targeted to mRNAs of associated proteins is demonstrated by the example of lipid metabolism.

**Keywords:** antisense oligonucleotide derivatives, lipid metabolism regulation.

---

Статья поступила 29 сентября 2015 г.