

New treatments for dyslipidemia

Nové liečebné prístupy k dyslipidémii

Murín J, Pernický M, Kiňová S

I. interná klinika LFUK a UNB Staré mesto, Bratislava, Slovenská republika

Murín J, Pernický M, Kinova S. **New treatments for dyslipidemia.** Cardiology Lett. 2014;23(3):197–206

Abstract. Cardiovascular diseases are the main reason for mortality and morbidity in the world, and also in our country. An important risk factor for cardiovascular disease is dyslipidemia, mainly hypercholesterolemia. A reduction of serum LDL cholesterol level (by diet but mainly by pharmacotherapy) decreases cardiovascular risk of these patients.

For the reduction of serum LDL cholesterol levels we use usually statins (mostly strong statins and used in higher doses), ezetimibe and their combination. New drugs are in the pipeline and just entering clinical practice. Among these drugs are ApoB production inhibitors (mipomersen), a microsomal transfer protein activation inhibitor (lomitapib), drugs supporting lipoprotein catabolism (mainly PCSK9 inhibitors) and some other drugs, for example ETC-1002.

Another possibility is an increase of serum HDL cholesterol level and we are here waiting for results of clinical studies with anacetrapib and evacetrapib. There is also some clinical research to influence positively lipoprotein Lp(a).

Where we are now, and what direction hypolipidemic treatment will follow, is the main message here. Ref. 77, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Key words: cardiovascular disease – hypercholesterolemia – LDL cholesterol – statins – ezetimibe – new hypolipidemics

Murín J, Pernický M, Kiňová S. **Nové liečebné prístupy k dyslipidémii.** Cardiology Lett. 2014;23(3):197–206

Abstrakt. Kardiovaskulárne ochorenia sú hlavnou príčinou mortality a morbidity vo svete i u nás. Významným rizikovým faktorom vzniku týchto ochorení je dyslipidémia, najmä hypercholesterolémia. Zníženie sérovej hladiny LDL cholesterolu (diétou, ale predovšetkým farmakologickou liečbou) významne redukuje kardiovaskulárne riziko pacientov.

V oblasti zníženia sérovej LDL cholesterolémie máme k dispozícii statíny (najmä silné a užívané vo vysokých dávkach), ezetimib a ich vzájomnú kombinačnú liečbu. Avšak prichádzajú aj nové lieky. Sú to inhibitory produkcie apolipoproteínu B (mipomersen), inhibitory aktivity mikrozomálneho transfer-proteínu triacylglycerolov (lomitapib), látky podporujúce lipoproteínový katabolizmus (najmä inhibitory PCSK9, od ktorých dnes veľa očakávame) a ešte sem zaraďujeme ďalšie látky, kde spomenieme ETC-1002.

Iným prístupom je zvyšovanie sérovej hladiny HDL cholesterolu a čakáme na výsledky klinických štúdií s anacetrapibom a evacetrapibom. A je i záujem priaznivo ovplyvniť lipoproteín Lp(a), hoci veľa liečebných možností tu nemáme.

O tom je článok, teda o tom, kde sa dnes nachádzame v oblasti hypolipidemickej liečby. Lit. 77, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Kľúčové slová: kardiovaskulárne ochorenia – hypercholesterolémia – LDL cholesterol – statíny – ezetimib – nové hypolipidemiká

Kardiovaskulárne (KV) ochorenie je dnes hlavnou príčinou morbidít a mortality v celom svete a ročne zodpovedá za asi 2 mil. úmrtí v EÚ (1). Záťaž KV ochoreniami však ďalej stúpa, podporuje to rastúca prevalencia nadhmotnosti/obezity s diabetom (2) a tak je potreba prevencie vzniku KV ochorení vitálnym činom (najmä sekundárna, ale i primárna). Súvisí s tým vyhľadávanie (veľmi) vysoko rizikových osôb u praktikov i špecialistov, a následne implementácia liečebných prístupov publikovaných v Odporúčaniach (3).

Dyslipidémie, predovšetkým hypercholesterolémia, sú dôležitým kardiovaskulárnym rizikovým faktorom a zníženie sérovej hladiny LDL cholesterolu (LDL-Ch) statínmi významne redukuje KV riziko pacienta. Dokladujú to výsledky mnohých klinických štúdií a výsledky aj v rutinej klinickej praxi. Experimentálne skúsenosti preukázali, že aj iné lipoproteíny majú úlohu pri náraste KV rizika. Statíny sú síce účinné, ale u veľmi rizikových osôb nevieme ich sérovú hladinu LDL-Ch znížiť tak výrazne, aby sme zabezpečili dostatočný pokles KV mortality i morbidít. A tak je záujem hľadať nové liečebné prístupy pri dyslipidémii.

Zníženie LDL cholesterolémie

Statíny

Statíny významne ovplyvňujú dyslipidémiu a priaznivý účinok liečby sa prejavuje v redukcii celkového KV rizika a mortality (v tejto oblasti sa vykonalo mnoho kontrolovaných randomizovaných klinických štúdií). S každým poklesom sérovej LDL-Ch o 1 mmol/l klesne riziko mortality na ischemickú chorobu srdca (ICHS) asi o 20 % a celková mortalita klesne asi o 12 % (4, 5). A práve preto sú dnes statíny prvostupňovou liečbou medzi hypolipidemikami u pacientov s KV ochoreniami, pričom u najrizikovejších pacientov sa dosahuje najvyšší benefit (6, 7). Avšak napriek liečbe statínmi u veľkej skupiny osôb zostáva stále vysoký výskyt KV príhod – hovoríme o zachovanom vysokom tzv. reziduálnom KV riziku (8 – 10).

Úlohu tu má stále vysoká sérová hladina cholesterolémie (najmä LDL cholesterolémie), obvykle aj sprievodná nízka sérová hladina HDL cholesterolu (HDL-Ch) čiastočne a tiež zvýšená triacylglycerolémia (11, 12). V pozadí môže byť nesprávna liečba (voľba nižších dávok statínov alebo neindikovanie liečby silnými statínmi) alebo nedostatočná adherencia pacientov k tejto liečbe (nižšia edukácia pacientov alebo iné činitele) a teda tieto osoby nie sú liečené tak, aby sa u nich dosiahla želaná hladina sérovej celkovej alebo LDL-Ch (12, 13). Pri upitracii statínov sa často užíva zdvojnásobenie dávky statínu, a to vedie k 6 % redukcii sérovej LDL-Ch (asi preto nie viac, že sa aktivujú kontra regulačné mechanizmy: je to zvýšená intestinálna absorpcia cholesterolu, ale i sekrecia PCSK9); miernym problémom je

i „nárast“ výskytu diabetu zvyšovaním dávky statínov, najmä u osôb s „pre-diabetickými“ charakteristikami. Napríklad v štúdií HPS2-THRIVE sa vyskytol nový diabetes v ramene liečby s niacinom (niacín/laropiprant) o 1,8 % viac a diabetes s komplikáciami o 3,7 % prípadov viac oproti „placebovému“ ramenu liečby (14). Taktiež štúdia JUPITER ukázala zvýšený nález novozisteného diabetes mellitus pri liečbe statínom, ktorý bol potvrdený aj v následnej metaanalýze 13 placebo kontrolovaných štúdií. U 91 140 sledovaných pacientov bolo o 9 % vyššie riziko vzniku diabetes mellitus OR: 1,09 (95 % CI 1,02 – 1,17). Toto riziko je významné pre vysoký výskyt osôb s prediabetom, kde liečba vysokými dávkami statínov môže urýchliť manifestáciu diabetes mellitus (15).

A teda násobenie dávky statínu má asi „viac“ (relatívne) nežiaducich účinkov než benefitov. Ak chceme výrazne znížiť sérovú hladinu LDL-Ch, tak riešením je skôr podať silný statín (atorvastatín, rosuvastatín) a podať ho v maximálnej dávke, než podať „slabší“ (menej potentný) statín. Výsledky z EUROASPIRE III surveya (2 273 pacientov s ICHS, osem západoeurópskych krajín) preukázali, že 46 % pacientov má vyšší sérový cholesterol ako $\geq 4,5$ mmol/l, ale až 43 % osôb liečených statínmi má tiež celkový sérový cholesterol $\geq 4,5$ mmol/l (12), a asi 2/3 pacientov liečených hypolipidemikami má aspoň jeden lipidický sérový parameter v abnormálnej úrovni (12, 13, 16). Teda potrebujeme intenzívnejšiu hypolipidemickú liečbu, hoci sú pacienti liečení statínmi.

Ezetimib

Ezetimib je zástupcom triedy hypolipidemík, ktoré znižujú hladiny sérovej LDL-C predovšetkým selektívnou inhibíciou vstrebávania cholesterolu v tenkom čreve. Ezetimib blokuje špecifický transportný proteín, nazývaný Niemann-Pick C1-like 1 proteín (NPC1L1) (17), ktorý sa nachádza na povrchu tzv. kefkovitého lemu sliznice tenkého čreva. Výsledkom blokády NPC1L1 je výrazné zníženie vstrebávania cholesterolu a ostatných sterolov pochádzajúcich z potravy a zo žľazových kyselín. Vďaka tomu dochádza k zníženiu dodávky LDL-Ch z čreva do pečene, čo vedie k intenzívnejšej biosyntéze a alokácii receptorov pre LDL-Ch na povrchu hepatocytov (18 – 20). Pokles sérových hladín LDL-Ch up-reguláciou LDL receptorov tak ďalej zvyšuje účinnosť zníženia vstrebávania cholesterolu v čreve a je podstatou synergického pôsobenia ezetimibu pri kombinácii so statínmi. NPC1L1 je exprimovaný aj na povrchu ľudských hepatocytov, kde sa podieľa na regulácii obsahu cholesterolu a iných sterolov v žľči. Aj tu podlieha tento transportný proteín blokáde ezetimibom po jeho vstrebaní sa do cirkulácie. Prípadné klinické prínosy blokády hepatálnych NPC1L1-transportérov však ostávajú nejasné (19), respektíve sa v súčasnosti študujú.

Výsledky klinických štúdií dokazujú, že ezetimib v monoterapii signifikantne znižuje hladiny LDL-Ch u chorých s hypercholesterolémiou (–17,2 % až –22,3 %) ($p < 0,01$)

v porovnaní s placebom (21, 22). Ezetimib v monoterapii signifikantne znižuje aj sérové hladiny triacylglycerolov (TG) asi o 8 % a zvyšuje hladiny HDL-Ch asi o 5 %. U pacientov s primárnou hypercholesterolémiou viedla monoterapia ezetimibom v dávke 10 mg/deň v trvaní 16 týždňov k významnej redukcii celkového cholesterolu, LDL-Ch a non-HDL-Ch, ako aj k redukcii hodnôt apoB (23).

U diabetikov 2. typu dochádza k expresii mRNK Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) proteínu (24), čo znamená, že sa tu zvyšuje absorpcia cholesterolu v tenkom čreve. Ezetimib znižuje aj mRNK expresiu jednak apoB-48, ale aj transportérov mastných kyselín v tenkom čreve. Tým znižuje aj hladinu cirkulujúcich chylomikrónov (25) a táto znížená hladina chylomikrónov má za následok zlepšenie metabolizmu glukózy (zlepšením inzulínovej senzitivity) (26).

Ako zlepšiť dosiahnutie cieľovej hodnoty LDL cholesterolu?

Použitie vysokej dávky „silného“ statínu (atorvastatín 80 mg, rosuvastatín 40 mg) je užitočným a úspešným prístupom k liečbe vysoko rizikových pacientov s ICHS. Tento prístup zatiaľ výrazne zaostáva u vysokorizikových pacientov s cerebrovaskulárnym a periférne vaskulárnym (aterosklerotickým) ochorením (27).

Iným prístupom je kombinovať liečbu ezetimibom so statínmi. Výsledky klinických štúdií dokazujú, že táto kombinácia významne znižuje hladiny sérových LDL-Ch častíc. Potvrdila to analýza 27 publikovaných, randomizovaných, dvojito zaslepených klinických štúdií (21 794 pacientov – 6 541 diabetikov a 15 253 nediabetikov, užívali kombináciu liečbu versus len liečbu statínom počas 4 – 24 týždňov), ktorá potvrdila, že kombinovaná liečba poskytla významne väčšiu redukcii sérového LDL-Ch (-39,1 %) v porovnaní s monoterapiou statínom (-23,0 %), ale tiež celkového cholesterolu, TG, non-HDL-Ch, apoB a hs CRP; a tiež významne väčšie zvýšenie HDL-Ch (28). Ezetimib blokuje resorpciu cholesterolu z čreva: asi 2/3 cholesterolu sa pritom vzťahuje na enterohepatálny obeh cholesterolu a 1/3 na diétny cholesterol. Či sa táto kombinácia liečba premení aj na prídavný klinický benefit, to preukáže štúdia IMPROVE-IT (29). Táto modalita sa v rutínnej klinickej praxi zatiaľ nevyužíva často (len u 14 % pacientov podľa štúdie DYSIS) (27), a je to na škodu pacientov. Sú síce liečení, ale nedostatočne, a preto ich KV reziduálne riziko ostáva stále veľmi vysoké.

Ezetimib a karotická ateroskleróza

1. Štúdia SANDS (Stop Atherosclerosis in Native Diabetics Study, americkí indiáni) mala pacientov randomizovaných do dvoch ramien (rameno s cieľom dosiahnuť sérovú hladinu LDL-Ch < 2,6 mmol/l versus rameno s cieľom pre LDL-Ch < 1,8 mmol/l, všetci chorí mali liečbu statínmi) a počas troch

rokov sledovali zmenu hrúbky intimo-mediálneho zhrubnutia karotíd, zmenu hodnoty hsCRP v sére a výskyt KV príhod. Až jedna tretina pacientov v agresívne liečenom ramene potrebovala na dosiahnutie cieľových hodnôt LDL-Ch < 1,8 mmol/l pridať ezetimibu. V ramene s LDL-Ch < 1,8 mmol/l až 62 % tých, ktorí užívali kombinovanú liečbu a 61 % pacientov na monoterapii vysokými dávkami statínov vykazovalo buď zastavenie progresie, alebo regresiu aterosklerotického postihnutia karotického riečiska v porovnaní s len 39 % pacientov v ramene liečby s tzv. štandardným cieľom redukcie LDL-Ch (t. j. s cieľom < 2,6 mmol/l) ($p < 0,001$) (30).

2. Štúdia VYCTOR (the Vytorin on Carotid Intima-Media Thickness and Overall Arterial Rigidity Study) sledovala tiež diabetikov s ischemickou chorobou srdca v troch ramenách liečby (pravastatín 40 mg/denne, simvastatín 40 mg/denne a simvastatín 20 mg/denne plus ezetimib 10 mg/denne) a s titráciou na dosiahnutie sérovej hladiny LDL-Ch < 2,5 mmol/l versus hladiny LDL-Ch < 1,8 mmol/l. Sledovali zmenu intimo-mediálneho zhrubnutia karotídy, zmenu hsCRP v sére a zmenu tuhosti ciev po jednom roku liečby. Len v agresívnom ramene liečby (kde bolo cieľom dosiahnutie sérovej hladiny LDL-Ch < 1,8 mmol/l) priaznivo ovplyvnili spomínané parametre. Pridanie ezetimibu významne prispelo k vyššej redukcii LDL-Ch v sére a ukázalo, že už štartovacie nízke dávky statínu + ezetimibu majú vyšší potenciál redukcie sérovej hladiny LDL-Ch ako liečba maximálnymi dávkami statínov (31).

Ezetimib a kardiovaskulárne príhody

1. Štúdia SEAS (Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis) mala dve ramená liečby (rameno liečby simvastatínom 40 – 80 mg/denne plus ezetimibom 10 mg/denne versus rameno liečby placebom) (32), ale nedokázala ovplyvniť progresiu aortálnej valvulárnej stenózy. To nedokázala ani liečba samotnými statínmi, ale v kombinovanom ramene liečby v trvaní 53 mesiacov preukázala táto štúdia významnú redukcii rizika vzniku ischemických KV príhod (15,7 %) versus v placebovom ramene liečby (20,1 %).

2. Štúdia SHARP (the Study of Heart and Renal Protection) sa zamerala na pacientov (spolu 9 270) s pokročilým renálnym ochorením. V ramene kombinovanej liečby simvastatínom 20 mg/denne plus ezetimibom 10 mg/denne v trvaní 4,9 rokov došlo k významnej 17-percentnej redukcii primárneho cieľa, t. j. výskytu závažných KV príhod, oproti liečbe placebom, ale všetci pacienti inak boli na štandardnej ostatnej liečbe (33). Benefit bol u nedialyzovaných, aj u dialyzovaných osôb. Je to dôležité zistenie, pretože u pacientov s pokročilou formou renálneho ochorenia (sú vo vysokom KV riziku) nie je liečba statínmi preukázateľne účinná a bezpečná.

V prípade osôb s familiárnou hypercholesterolémiou musíme siahnuť ešte k ďalšej prídavnej liečbe: sú to viazače žľových kyselín (bile acid binding resins) a v ojedinelých

prípadoch aj k lipoproteínovej aferéze (najmä u homozygotnej formy ochorenia, či pri „non responderoch“ s predchádzajúcou liečbou) (34).

Kombinácia statínov s fibrátmi, najmä s fenofibrátom je možná, ale veľký efekt na zníženie sérového LDL-Ch to obvykle nemá, skôr tu ovplyvníme triacylglycerolému (pokles). Niacín dnes v liečbe dyslipidémie asi skončil.

A tu je vhodná ešte nasledovná poznámka k dnešnému vývoju hypolipidemickej liečby v oblasti redukcie LDL cholesterolémie. Poznatky získané od osôb s genetickými osobitostnými vlastnosťami (pacienti s familiárnou hypercholesterolémiou s vysokou sérovou hladinou LDL-Ch versus pacienti s deficitom PCSK9, a preto naopak s nízkou sérovou hladinou LDL-Ch v sére, pričom v oboch prípadoch pacientov ide o dlhotrvajúci „chorobný versus priaznivý“ stav) preukázali, že dlhodobé riziko či dlhodobý benefit pre pacientov (podľa nízkych alebo vysokých hladín LDL-Ch v sére, a ten je u týchto ľudí vlastne pre ich genetické pozadie prítomný od narodenia) je vlastne oveľa väčšie, než doteraz prezrádzali štúdie so statínmi. Osobitosťou je tu iste dlhodobosť zvýšeného versus zníženého sérového LDL-Ch, napríklad v prípade absencie PCSK9 býva až 50 % redukcia LDL-Ch (35). Pre dnešnú klinickú prax z toho vyplýva väčší klinický benefit iniciácie znižovania LDL-Ch vo väčšej fáze života a asi i pri primárnej prevencii (keď uvažujeme o celoživotnom riziku občana-osoby-pacienta) (36). Ide tu o zabránenie (spomalenie) vývoja aterosklerózy od začiatku a nie – ako je dnes zvykom – len o stabilizáciu „nestabilného“ plaku pri už rozvinutej ICHS (kedy tiež síce efekt dosiahneme, ale už relatívne malý a/alebo krátkodobý). A či tieto úvahy, alebo hypotézy platia, mohli by overiť dlhodobé klinické štúdie (či štúdia). A také štúdie, najmä s PCSK9 inhibítormi, práve teraz prebiehajú.

Nové (nádejné?) hypolipidemiká

Nové farmaká, cielené k ďalšiemu zníženiu sérového LDL-Ch, sa vyvíjajú ako prídavné látky („add-on“) k liečbe statínmi. Možno ich kategorizovať takto: a) látky interferujúce so syntézou lipoproteínov – ovplyvňujúce produkciu apolipoproteínu B (apoB) alebo inhibitory aktivity mikrozomálneho triacylglycerolového transfer proteínu (MTP) a b) látky podporujúce lipoproteínový katabolizmus (teda inhibitory proproteín-konvertázy subtilizín-kexin typ 9, PCSK9).

Látky interferujúce so syntézou lipoproteínov

Produkcia VLDL častíc (very low-density lipoprotein) v pečeni významne závisí od dvoch proteínov: od apoB a od MTP. Proteín apoB je štrukturálnou súčasťou častice VLDL a vyžaduje progresívnu „lipidáciu“ (prostredníctvom MTP, čo je chaperón kotviaci v endoplazmatickom retikule), aby apoB dosiahlo konformačnú integritu v procese vzniku lipoproteínu. Ak do tohto procesu vieme zasiahnuť, tak ovplyvníme

produkciu lipoproteínu a redukuje seróvu hladinu LDL cholesterolu.

1. Inhibitory produkcie apolipoproteínu B

Intenzívny výskum sa dnes týka ovplyvnenia produkcie apoB v procese génovej translácie. Jeden prístup je blokovat mRNA-transláciu génu použitím tzv. ASO (antisense oligonukleotidu), čo je jednovláknitý oligonukleotid „komplementárny“ k mRNA. Po nadviazaní sa ASO na mRNA dôjde k inhibícii translácie a neskôr k degradácii mRNA ribonukleázou. Keďže je ASO kinetika charakterizovaná veľkou a rýchlou distribúciou do pečene, tak je tento „liečebný prístup“ atraktívny pre redukciu syntézy proteínov, napríklad apoB, v pečeni. V experimente (myš) to veľmi dobre funguje a efekt závisí od dávky ASO, a následne dôjde k redukcii sérového LDL-Ch, počtu LDL častíc, triacylglycerolov a tiež sérového Lp(a).

Už máme prvé klinické skúšky aj u človeka s blokovaním mRNA-translácie génu pre produkciu apoB. Ide o látku mipomersen, podávanú v dávke 200 mg/týždenne (37). Pri heterozygotnej forme familiárnej hypercholesterolémie (FH) klesá sérový LDL-Ch pri tejto liečbe asi o 21 %, pri homozygotnej forme FH o 25 % a pri ťažkej hypercholesterolémii a u osôb s vysokým KV rizikom asi o 36 %. Efekt stúpa s dávkou, ale podobne stúpa i výskyt nežiaducich účinkov – lokálna reakcia po vpichu, niekedy vzostup ALT viac než na trojnásobok hornej normy. Mipomersen je účinný aj v kombinácii so statínom podávaným súčasne s ezetimibom alebo bez neho, s podávaním sekvestrantov žľových kyselín alebo bez ich podávania, avšak išlo počtom len o malé štúdie, obvykle vo fáze II či III. Obava výskumníkov je z akumulácie tuku v pečeni pri tejto liečbe. Zisťujú to ďalšie štúdie. Začiatkom roku 2013 regulačný úrad v USA (FDA) povolil mipomersen na liečbu homozygotnej formy FH, kým obdobný úrad v EU (EMA) „vyčkáva“ na súhlas s uvedením lieku pre jeho možné bezpečnostné riziko.

2. Inhibitory aktivity mikrozomálneho transfer-proteínu triacylglycerolov (MTP)

Tento proteín (MTP) je lokalizovaný v endoplazmatickom retikule hepatocytov a enterocytov. Sprostredkúva tvorbu lipoproteínov, obsahujúcich apoB, v pečeni a čreve (38). Isté mutácie MTP génu spôsobujú abetalipoproteinémiu, čo je zriedkavé genetické ochorenie s absenciou apoB lipoproteínov v sére. U takto postihnutých býva ťažká malabsorpcia so zlou prognózou postihnutých. Ale tento efekt je podkladom toho, že inhibícia aktivity MTP vie redukovať sérový cholesterol a tiež lipoproteíny, ktoré obsahujú apoB.

V klinickom testovaní je MTP inhibitor lomitapib (fáza III, viaceré štúdie). V monoterapii či v kombinácii s konvenčnou hypolipidemickou liečbou pri homozygotnej forme FH alebo u osôb s ťažkou hypercholesterolémiou redukuje lomitapib sérové hladiny LDL-Ch, apoB, non-HDL-Ch a tiež Lp(a). Efekt vyššej dávky lomitapibu na redukciu sérového LDL-Ch je v úrovni 50 %. Nežiaduce účinky sú nasledovné – vzostup

ALT a AST, akumulácia tuku v pečeni (asi o 10 – 30 %) a väčšia frekvencia stolíc. V istej porovnávacej klinickej štúdií (39) redukoval ezetimib sérový LDL-Ch o 20 %, lomitapib o 30 % a ich kombinácia až o 46 %. Lomitapib redukoval i hladiny celkového cholesterolu o 23 – 34 %, non-HDL-Ch o 27 – 41 %, apoB o 24 – 37 % a Lp(a) o 16 – 17 %. Koncom roku 2012 lomitapib dostal „zelenú“ u regulačného úradu FDA v USA pre osoby s homozygotnou FH. Podobná reakcia sa očakáva i z regulačného úradu EU (EMA).

Látky podporujúce lipoproteínový katabolizmus

Sem patria inhibítory PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitors). O čo tu ide? Plazmatická hladina LDL-Ch je významne determinovaná aj geneticky a viaceré molekulárne genetické defekty spôsobujú extrémne sérové hladiny LDL-Ch. Významným faktorom v metabolizme LDL cholesterolu je jeho LDL receptor, pretože viaže cholesterol z cirkulácie a následne ho vnútri bunky (v hepatocyte) vie uvoľniť k lyzozomálnej degradácii. A LDL receptor, oslobodený vnútri bunky od cholesterolu, sa potom vracia späť na plazmatickú membránu (hepatocytu), kde je pripravený viazať ďalší LDL-Ch z plazmy. A takto LDL receptor „cirkuluje“ medzi plazmatickou membránou a lyzozómom vnútri bunky (40).

Proprotein konvertáza subtilisín hexin typ 9 (PCSK9) má hlavnú úlohu v uvedenom procese „recyklácie LDL receptora v bunke“, pretože umožňuje degradáciu LDL receptora vnútri bunky hepatocytu a tak bráni jeho recyklácii späť k membráne hepatocytu. A tak sa stal PCSK9 tiež novým liečebným cieľom v hypolipidemickej liečbe. Výhodnou je skutočnosť, že jeho inhibícia pôsobí (vzhľadom na redukcii sérovej hladiny LDL-Ch) synergicky s ostatnou liečbou (najmä so statínmi) (40). V roku 2005 sa preukázala kauzálna asociácia medzi dvoma relatívne častými mutáciami v PCSK9. Boli to mutácie typu „loss-of-function“, spojené s nízkou sérovou hladinou LDL cholesterolu (41, 42). Osoby s uvedenými mutáciami (PCSK9-679X, PCSK9-142X) mali sérové hladiny LDL-Ch asi 2,5 mmol/l (oproti osobám bez týchto mutácií, kde to bolo 3,6 mmol/l) a tento rozdiel v poklese LDL-Ch v sére viedol k obrovskej 88 % redukcii globálneho koronárneho rizika (41, 42). A tak sa dnes stal PCSK9 atraktívnym cieľom liečebného ovplyvnenia s cieľom redukovat sérovú hladinu LDL-Ch.

Úloha PCSK9 pri degradácii LDL receptora

PCSK9 spôsobuje redukcii množstva LDL receptorov na povrchu hepatocytov (experimenty) (43, 44). PCSK9 je secerňovaný hepatocytmi, ale mierna produkcia je aj v enterocytoch a obličke, (45), potom cirkuluje v plazme a viaže sa na LDL receptor a následne je spolu s ním (ale aj s LDL-Ch na ňom nadviazaným) internalizovaný („stiahnutý“) do vnútra hepatocytu a PCSK9 prispieje k tomu, že v lyzozómoch

sa degraduje nielen LDL-Ch, ale aj sám LDL-receptor (a ten potom chýba na povrchu hepatocytu pre záchyt LDL-Ch zo séra) (46). Akcieschopnosť PCSK9 nie je v jeho katalytickej aktivite, ale funguje ako chaperón (47). Hladiny PCSK9 v plazme sú prediktorom klinických príhod u pacientov s KV ochorením (48).

Regulácia tvorby PCSK9 v organizme

Hladiny PCSK9 v plazme sú kontrolované hormonálnym (prostredníctvom rastového hormónu) a nutričným (pokles pri hladovaní) stavom (49), ale aj hladinou intracelulárneho cholesterolu (50). Statíny zvyšujú hladiny PCSK9 v plazme, ale oslabenie PCSK9 pôsobenia zvyšuje hypolipidemický efekt statínov (51). A tak inhibícia PCSK9 účinku zvyšuje aj redukcii LDL-Ch v sére pri statínovej liečbe. Je tu teda synergia vplyvov oboch liečebných prístupov (inhibície PCSK9 s pridaním statínu) a táto kombinovaná liečba zníži významne následné KV riziko.

Ako PCSK9 inhibovať?

Treba pripomenúť, že jestvujú osoby (homozygoti) s genetickou mutáciou, pri ktorej nastane strata funkcie (či pôsobenia) PCSK9, a to vlastne pre neprítomnosť PCSK9 v organizme. Tieto osoby sú pritom inak zdravé, fertílne a majú veľmi nízku sérovú hladinu LDL-Ch (52, 53). Jestvujú tri prístupy farmakologickej inhibície PCSK9 u ľudí: 1. Prístup pomocou „gene silencing“ (uspanie génovej činnosti) ovplyvňuje intracelulárne i extracelulárne funkcie PCSK9. Napríklad s.c. podanie „PCSK9 antisense oligonucleotidu“ (ASO) zvyšuje dvojnásobne hepatálnu expresiu LDL receptorov a tým redukuje u myši celkový cholesterol o 53 % (54) a potvrdili to i ďalšie experimenty 2. „Mimetické peptidy“ ovplyvňujú cirkulujúci PCSK9 a teda len jeho extracelulárnu funkciu. Ide o peptidy napodobňujúce tzv. EGF-A doménu LDL receptora, ktorá potom reaguje s PCSK9 na plazmatickej membráne a tým inhibuje funkciu PCSK9 (55). 3. „Monoklonálne protilátky“ tiež ovplyvňujú cirkulujúci PCSK9 a teda len jeho extracelulárnu funkciu. Tieto protilátky rozpoznávajú isté epitopy na PCSK9 a blokujú tým (po nadviazaní sa na PCSK9) väzbu PCSK9 s LDL receptorom (56). Viacerí výrobcovia testujú tento hypolipidemický prístup, ktorý je v oblasti redukcie LDL-Ch veľmi potentný.

Teda inhibícia PCSK9 je atraktívnym cieľom liečby, najmä u pacientov, ktorí pri liečbe statínmi (napriek ich maximálnej dávke) nedosahujú cieľové hladiny LDL-Ch. Najďalej v tejto oblasti je použitie monoklonálnych protilátok pri inhibícii PCSK9. Liečba je nielen veľmi účinná, ale i bezpečná. Očakávame onedlho (?) výsledky klinických štúdií a veríme, že potvrdia i pokles KV mortality/morbidít. Isté menšie štúdie preukázali, že pokles LDL-Ch v sére je asi o 30 – 40 %, čo je pozoruhodný efekt.

Iné látky

Novou hypolipidemickou látkou je ETC-1002. Je to malá molekula, ktorá má dve úlohy pri centrálnej kontrole metabolických dráh lipidov a cukrov. Prvou úlohou je inhibícia adenosín trifosfát citrát lyázy, enzýmu potrebného na produkciu adenosín trifosfát citrátu. Ten je esenciálny pre syntézu mastných kyselín i cholesterolu. Druhým efektom je aktivácia enzýmu AMPK, t. j. adenosín monofosfát proteín kinázy, ktorá sa vyskytuje v pečeni, priečne pruhovalých svaloch a v mozgu, pričom je to proteín s výnimočnou funkciou pri nasmerovávaní energetických substrátov v bunkách. Je tiež senzorom prítomnosti deplécie adenosín trifosfátu (ATP) (t. j. deplécie energie, reaguje teda na prítomnosť AMP, adenosín monofosfátu), a ak to zistí, potom obráti či nasmeruje energetické substráty v období ich potreby (napríklad pri svalovej práci) k ich presunu na miesto ich spotreby. Ovplyvňuje viaceré metabolické dráhy súčasne a koordinovane, t. j. zvyšuje príjem a spotrebu glukózy i mastných kyselín a súčasne redukuje anabolické procesy. Ide tu o vzostup beta-oxidácie mastných kyselín, o glukoneogézu a zvýšenie počtu mitochondrií v bunke (57). Sú tiež doklady o tom, že AMPK má tiež svoju úlohu pri zvýšení metabolickej aktivity mitochondrií (aspoň pri akútnej telesnej aktivite vyžadujúcej ďalšiu spotrebu mastných kyselín). A tu AMPK zvyšuje aktivitu PPAR gama-koaktivátora-1 (PGC) alfa, čo je transkripčný faktor a vieme o jeho úlohe pri regulácii génov ovládajúcich ketogézu a glukoneogézu. Aktivácia AMPK znižuje syntézu Ch a mastných kyselín a tým aj triacylglycerolov. Aj GLUT-4 (glukózový transportér) v svalstve sa zvýšene translokuje a tento efekt vzniká pri telesnej aktivite (58, 59). Okrem toho AMPK zvyšuje fosforyláciu glukózy pomocou hexokinázy v svalových bunkách, a tým napomáha prístoku glukózy do svalu (58).

V animálnych experimentoch ETC-1002 zlepšuje hladinu plazmatických triacylglycerolov aj cholesterolu, ovplyvňuje priaznivo tuk v pečeni, zápalové markery, glykemickú kontrolu, krvný tlak a tiež aterosklerózu (60 – 62). Klinické štúdie vo fáze I u ľudí (vyšetrovanie tzv. single-dose tolerability do dávky 250 mg a tzv. multiple-dose tolerability do dávky 220 mg/denne; spolu to analyzovali u 77 osôb) nepreukázali vážnejšie nežiaduce účinky. A tak liečivo postúpilo do fázy II klinického skúšania. Istá multicentrická randomizovaná, dvojito-slepá a placebom kontrolovaná štúdia (177 pacientov, zvýšený LDL-Ch v rozsahu 3,4 mmol/l – 5,7 mmol/l, stratifikácia pacientov podľa vstupnej sérovej hladiny triacylglycerolov: < 3,9 mmol/l alebo 3,9 – 10,3 mmol/l, randomizácia k liečbe 40, alebo 80 či 120 mg ETC-1002/denne versus k liečbe placebom, trvanie liečby 12 týždňov) sledovala zmenu LDL-Ch a iných lipidov séra v priebehu liečby. Výsledky preukázali jednak a) pokles priemernej sérovej hladiny LDL-Ch o 17,9 % (40 mg dávka), o 25 % (80 mg dávka) a o 26,6 % (120 mg dávka) oproti „len“ 2,1 % poklesu u placeba, ale b) ETC-1002 znižovala významne

a dávkovo závisle aj non-HDL-Ch, apoB a aj počet LDL častíc, pričom c) hladiny sérových triacylglycerolov ostali nezmenené a d) liečba bola bezpečná (63).

Zvýšenie HDL cholesterolémie

Inverzný vzťah medzi sérovou hladinou HDL-Ch a rizikom vzniku ICHS je známy z epidemiologických štúdií. Predklinické údaje preukazujú zase ateroprotektívnu úlohu HDL. A tak sa stalo atraktívnym cieľom v liečbe aterosklerotických ochorení aj „dvíhanie“ sérovej hladiny HDL-Ch ako prídavnej liečby k liečbe statínmi (64). HDL je centrálnym komponentom v tzv. reverznom cholesterolovom transporte, kde sa prenáša nadbytočný cholesterol z periférnych buniek, vrátane z penových buniek (makrofágov) v arteriálnej stene, do pečene pre intestinálnu exréciu (65). Okrem toho HDL-Ch vykazuje i iné prídavné priaznivé účinky: protizápalové, antitrombotické a antioxidačné, a tým zlepšuje endotelovú funkciu (66).

Ako zvýšiť sérovú hladinu HDL cholesterolu?

Preukázali to sledovania (a štúdie) s niacinom, fibrátmi a s PPAR gama agonistami. Ale ich účinok bol malý.

Inými možnosťami je podávanie purifikovaného apoA-I, podávanie mimetických peptidov (mimetiká), ďalej apoA-I, agonistov pečeneového X receptoru (LXR agonisty) a napokon o podávanie inhibítorov CETP (67). Najďalej sa v klinickom testovaní dostali posledne uvedené látky (inhibítory cholesterol ester transfer proteínu, CETP).

Ako CETP inhibítory pôsobia?

CETP je syntetizovaný v pečeni a tukovom tkanive a je secernovaný do cirkulácie. CETP sprostredkúva transfer cholesterol-esteru z HDL na apoB-lipoproteíny (obvykle VLDL a LDL) výmenou za triacylglyceroly (s názvom „heterotypický transfer“). Následne apoB-lipoproteíny prenesú (odovzdajú) cholesterol do hepatocytu (viazaním sa na LDL receptor hepatocytu – ide o nepriamu formu reverzného cholesterolového transportu) (68, 69). CETP sprostredkúva aj transfer cholesterol-esteru medzi subtypmi HDL (ide o tzv. homotypický transfer) a podporuje tvorbu veľkých HDL-2 častíc a tiež apoA-I (bezlipidových) častíc (70). CETP inhibítory inhibujú teda hetero- a aj homotypické transfery (69). Osoby s deficitom CETP aktivity (pre prítomné genetické mutácie) majú významne zvýšené hladiny HDL-Ch v sére (71). A isté pozorovania preukázali, že tieto osoby mávajú (asi) menej KV príhod. To viedlo k spusteniu klinických štúdií s inhibítormi CETP, s cieľom popri zvýšení sérovej hladiny HDL-Ch priaznivo ovplyvniť (redukovať) najmä výskyt KV príhod.

Inhibítory CETP (cholesterol ester transfer proteínu) teda vznikli najmä kvôli zvyšovaniu sérového HDL-Ch. Ale redukujú i sérové hladiny VLDL a LDL častíc. Dve prvé látky (torcetrapib, dalcetrapib) v klinických štúdiách neboli úspešné. V klinickom testovaní sú ešte dve ďalšie látky, čo sú veľmi potentné inhibítory CETP. Zistíme, či obstoja pri testovaní. Prvou je anacetrapib (podávaný v dávke 100 mg/d), ktorý redukuje u pacientov s ICHS, či s ekvivalentmi ICHS, sérový LDL-Ch o 40 % a zvyšuje sérový HDL-Ch o 138 %, pričom neovplyvňuje nepriaznivo ani tlak krvi a ani aldosteronémiu (štúdia DEFINE, 1 623 pacientov, 18-mesačné trvanie) (72). Testuje sa v štúdiu REVEAL (štúdia vo fáze III, asi 30 000 pacientov s ICHS, s cerebrovaskulárnym ochorením alebo periférne vaskulárnym ochorením, trvanie štyri roky, jej ukončenie sa plánuje v roku 2017) (73). Druhou je evacetrapib (100 mg/d), ktorý v kombinácii so statínom redukuje sérový LDL-Ch o ďalších 12 % a zvyšuje HDL-Ch o 80 %. Testuje sa v štúdiu ACCELERATE. Vzhľadom na bezpečnosť má málo nežiaducich účinkov (74).

Anacetrapib

Je to potentný CETP inhibítor a už sme spomínali u neho významné zvýšenie sérového HDL-Ch, ale i významnú redukciju plazmatického LDL-Ch. HDL častice pacientov liečených anacetrapibom vykazujú zvýšenú kapacitu odoberania cholesterolu z makrofágov a majú i veľký protizápalový vplyv (75). Účinnosť a bezpečnosť anacetrapibu zhodnotovala už uvedená štúdia DEFINE (the Determining the Efficacy and Tolerability of CETP Inhibition with anacetrapib). V štúdiu REVEAL (Randomized Evaluation of the Effects of Anacetrapib through Lipid-modification) sa v súčasnosti testuje účinnosť tejto liečby.

Látky znižujúce sérovú hladinu Lp(a)

Isté klinické a experimentálne práce preukázali, že lipoproteín Lp(a) má kauzálnu úlohu v podpore aterogenézy (76). Nie je úplne jasné, či tento nepriaznivý efekt ide cez proaterogénne mechanizmy alebo cez prokoagulačné mechanizmy, alebo využíva oba mechanizmy. Oproti sérovému LDL-Ch je Lp(a) refraktérny proti vplyvom zmeny životného štýlu, ale je rezistentný i proti vplyvom liečebnej intervencie.

Statíny mierne znižujú zvýšené sérové hladiny Lp(a) u pacientov s heterozygotnou FH. V štúdiu Coronary Drug Project niacin redukoval sérové hladiny Lp(a) až o 40 %, a to v závislosti od použitej dávky. Redukoval i sérový LDL-Ch, celkový Ch, triacylglyceroly, remnantný Ch a zvyšoval HDL-Ch (76). Vplyv liečby fibrátmi sa zisťoval len v malom počte štúdií a efekt nie je z týchto štúdií jasný či jednoznačný, skôr je nepatrný. V ďalších štúdiách s niacinom sa

výsledky o ovplyvnení sérového Lp(a) očakávajú, no zatiaľ nie sú dostupné.

Nemáme, ale potrebujeme, intervenčné klinické štúdie zamerané na plazmatický Lp(a). Skúša sa tu selektívna Lp(a) aferéza (76). K iným látkam, ktoré zabezpečujú redukciju sérového Lp(a), asi v úrovni o 10 %, patria aspirín, L-carnitín, kyselina askorbová s L-lyzínom, kalciové blokátory, ACE inhibítory, androgény, estrogény a ich náhrady, napríklad tibolon, ale aj antiestrogény (napríklad tamoxifén) (77).

Podmienkou produkcie lipoproteínu Lp(a) je „lipidácia“ apoB. A tak nie je prekvapením, že mipomersen a lomitapib spôsobujú tiež redukciju sérového Lp(a). Mipomersen asi o 40 % – 50 % a lomitapib o 17 %.

PCSK9 inhibícia tiež vedie k redukcii sérového Lp(a), a to asi v rozsahu o 25 % – 30 %. Asi tu nastáva zvýšená expresia LDL receptorov, čím klesne (pôsobením inhibítorov PCSK9) hladina sérového LDL-Ch a potom jej nie je dostatok pre interakciu s apo(a), aby vznikol Lp(a) (78).

Isté predklinické štúdie preukázali, že pokles sérového Lp(a) sa dá dosiahnuť aj podaním ASO (antisense oligonucleotide).

Dnes vieme, že potrebujeme ďalší výskum o metabolizme Lp(a). Len tak nájdeme nové selektívne a potentné liečebné prístupy pre pokles Lp(a).

Záver

Statíny v súčasnosti zabezpečujú efektívnu a významnú redukciju sérového LDL-Ch, non-HDL-Ch a apoB. Predovšetkým, ak podávame „silné“ statíny a vo vysokých dávkach. Ale i tak u mnohých pacientov nedosiahneme, a to ani ich maximálnymi dávkami, želané cieľové hodnoty sérových lipidov. Niektorí pacienti okrem toho netolerujú vysoké dávky statínov. Časť pacientov zase neužíva lieky podľa predpisu, a to z rôznych príčin. A tak naďalej mnohí pacienti ostávajú stále vo vysokom kardiovaskulárnom reziduálnom riziku. Potrebujeme k statínom preto i prídavnú liečbu. V súčasnosti už aj na Slovensku je k dispozícii fixná kombinácia statínu s ezetimibom, čo jednak zabezpečí výraznejší pokles LDL-Ch v porovnaní so zvyšovaním dávky statínu a rovnako predstavuje výhodnú voľbu pre tých pacientov, u ktorých sa cieľové hodnoty LDL-Ch nedosahujú preto, že neužívajú pravidelne predpísanú liečbu. Alternatívou pre najrizikovejších pacientov je kombinovať silný statín vo vysokej dávke s ezetimibom. V budúcnosti sa očakávajú ďalšie liečivá na kombináciu so statínmi. Sľubné sú dnes inhibítory PCSK9, ale i ďalšie látky. Čakáme na výsledky veľkých klinických štúdií v tejto oblasti. Ale aj sérový lipoproteín Lp(a) je atraktívnym liečebným cieľom. Čo však ešte dnes nevieme, je skutočnosť, či redukciou sérového Lp(a) budeme schopní redukovať i výskyt kardiovaskulárnych príhod. Ale výskum to iste v krátkom čase zistí.

Dnes nám neostáva iné, než použiť (umne a podľa výšky KV rizika pacienta) zatiaľ v článku uvedené možnosti hypolipidemické liečby.

Literatúra

- Nichols M, Townsend N, Luengo-Fernandez R, et al. European Cardiovascular Disease Statistics 2012. European Heart Network, Brussels, European Society of Cardiology, Sophia Antipolis.
- Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27:1047-1053.
- Perk J, De Backer G, Gohlke H, et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACRP). *Eur Heart J* 2012;33:1635-1701.
- Baigent C, Keech A, Kearney PM, et al. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators: Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005;366:1267-1278.
- Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators, Kearney PM, Blackwell L, Collins R et al. Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. *Lancet* 2008;371:117-125.
- Grundey SM, Cleeman JI, Merz CN, et al. National Heart, Lung, and Blood Institute; American College of Cardiology Foundation; American Heart Association: Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation* 2004;110:227-239.
- Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and other Societies on Cardiovascular disease Prevention in Clinical practice: European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary. *Eur Heart J* 2007;28:2375-2414.
- Shah PK, Kaul S, Nilsson J, et al. Exploiting the vascular protective effects of high density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming. Part I. *Circulation* 2001;104:2376-2383.
- Gotto AM Jr. High-density lipoprotein cholesterol and triglycerides as therapeutic targets for preventing and treating coronary artery disease. *Am Heart J* 2002;144(Suppl 6):S33-S42.
- Barter PJ, Puranik R, Rye KA. New insights into the role of HDL as an anti-inflammatory agent in the prevention of cardiovascular disease. *Curr Cardiol Rep* 2007;9:493-449.
- McBride P. Triglycerides and risk for coronary artery disease. *Curr Atheroscler Rep* 2008;10:386-390.
- Kotseva K, Wood D, De Backer G, et al. EUROASPIRE Study Group: Cardiovascular prevention guidelines in daily practice: a comparison of EUROASPIRE I, II, and III surveys in eight European countries. *Lancet* 2009;373:929-940.
- Van Ganse E, Laforest L, Bure T et al. Mixed dyslipidemia among patients using lipid-lowering therapy in French general practice: an observational study. *Clin Ther* 2007;29:1671-1681.
- HPS2-THRIVE Collaborative Group. HPS2-THRIVE randomized placebo-controlled trial in 25 673 high-risk patients of ER niacin/laropiprant: trial design, pre-specified muscle and liver outcomes, and reasons for stopping study treatment. *European Heart Journal* 2013; 34:1279-1291.
- Preiss D, Tikkanen MJ, Welsh P, et al. Lipid-Modifying Therapies and Risk of Pancreatitis. A Meta-analysis. *JAMA* 2012;308:804-811.
- Phatak H, Wentworth C, Sazonov V, et al. Prevalence and predictors of lipid abnormalities in patients treated with statins in the UK general practice. *Atherosclerosis* 2009;202:225-233.
- Garcia-Calvo M, Lisnock J, Bull HG, et al. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:8132-8137.
- Sudhop T, Lütjohann D, Kodal A, et al. Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans. *Circulation* 2002;106:1943-1948.
- Bays HE, Neff D, Tomassini JE, et al. Ezetimibe: cholesterol lowering and beyond. *Expert Rev Cardiovas Ther* 2008;6:447-470.
- Firas J, Al Badarin MD, Iftikhar J, et al. Impact of ezetimibe on atherosclerosis: Is the jury still out ? *Mayo Clin Proc* 2009;84:353-361.
- Bays HE, Moore PB, Dreihobl MA, et al. Ezetimibe Study Group. Effectiveness and tolerability of ezetimibe in patients with primary hypercholesterolemia: pooled analysis of two phase II studies *Clin Ther* 2001;23:1209-1230.
- Knopp RH, Dujovne CA, Le Beut A and Ezetimibe Study Group. Evaluation of the efficacy, safety, and tolerability of ezetimibe in primary hypercholesterolaemia: a pooled analysis from two controlled phase III clinical studies. *Int J Clin Pract* 2003;57:363-368.
- Kalogirou M, Tsimihodimos V, Gazi I, et al. Effect of ezetimibe monotherapy on the concentration of lipoprotein subfractions in patients with primary dyslipidaemia. *Curr Med Res Opin* 2007;23:1169-1176.
- Lally SE, Owens D, Tomkin GH. Sitosterol and cholesterol in chylomicrons of type 2 diabetic and non-diabetic subjects: the relationship with ATP binding cassette proteins G5 and G8 and Niemann-PickC1-like 1 mRNA. *Diabetologia* 2007;50:217-219.
- Sandoval JC. Molecular Mechanism of Ezetimibe-induced Attenuation of postprandial Hypertriglyceridemia. *J Atheroscler Thromb* 2010;17:914-924.
- Bajaj M, Suraamornkul S, Kashyap S, et al. Sustained reduction in plasma free fatty acid concentration improves insulin action without altering plasma adipocytokine levels in subjects with strong family history of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4649-4655.
- Ferrieres J, Amber V, Crisan O, et al. Total Lipid Management and Cardiovascular Disease in the Dyslipidemia International Study. *Cardiology* 2013;125:154-163.
- Leiter LA, XZ, AB, et al. Lipid-altering efficacy and safety profile of combination therapy with ezetimibe/statin vs statin monotherapy in patients with and without diabetes: an analysis

- of pooled data from 27 clinical trials. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2011;13:615-628.
29. Cannon CHP, et al. Rationale and design of IMPROVE-IT (Improved Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy International Trial): Comparison of ezetimibe/simvastatin versus simvastatin monotherapy on cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2008;156:826-832.
 30. Fleg JL, Mete M, Howard BV, et al. Effect of statins alone versus statins plus ezetimibe on carotid atherosclerosis in type 2 diabetes: the SANDS (Stop Atherosclerosis in Native Diabetics Study) trial. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:2198-2205.
 31. Meaney A, Ceballos G, Asbun J, et al. The Vytorin on Carotid Intima-Media Thickness and Overall Arterial Rigidity (VYCTOR) Study. *J Clin Pharmacol* 2009;49:838-847.
 32. Kashani A, Sallam T, Bheemreddy S, et al. Review of side-effect profile of combination ezetimibe and statin therapy in randomized clinical trials. *Am J Cardiol* 2008;101:1606-1613.
 33. Baigent C, Landray MJ, Reith C, et al. for the SHARP Investigators. The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomized trial. *Lancet* 2011;377:2181-2192.
 34. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries S, et al. Familial hypercholesterolemia is underdiagnosed and undertreated in the general population. Consensus statement of the Eur Atheroscl Society. *Eur Heart J* 2013;34:3478-3490.
 35. Ference BA, Yoo W, Alesh I, et al. Effect of long-term exposure to lower low-density lipoprotein cholesterol beginning early in life on the risk of coronary heart disease: a Mendelian randomization analysis. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:2631-2639.
 36. Berry JD, Dyer A, Cai X, et al. Lifetime risks of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2012;366:321-329.
 37. Visser ME, Witztum JL, Stroes ES, Kastelein JJ. Antisense oligonucleotides for the treatment of dyslipidemia. *Eur Heart J* 2012;33:1451-1458.
 38. Calandra S, Tarugi P, Speedy HE, et al. Mechanisms and genetic determinants regulating sterol absorption, circulating LDL levels, and sterol elimination: implications for classification and disease risk. *J Lipid Res* 2011;52:1885-1926.
 39. Samaha FF, McKenney J, Bloedon LT, et al. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein alone or with ezetimibe in patients with moderate hypercholesterolemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008;5:497-505.
 40. Lambert G, Sjouke B, Choque B, et al. The PCSK9 decade. *J Lipid Research* 2012;53:2515-2524.
 41. Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, et al. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet* 2005;37:161-165.
 42. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH Jr, et al. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med* 2006;354:1264-1272.
 43. Park SW, Moon YA, and Horton JD. Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in a mouse liver. *J Biol Chem* 2004;279:50630-50638.
 44. Lallanne F, Lamert G, Amar MJ, et al. Wild-type PCSK9 inhibits LDL clearance but does not affect apoB-containing lipoprotein production in mouse and cultured cells. *J Lipid Res* 2005;46:1312-1319.
 45. Zaid A, Roubisova A, Essalmani R, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology* 2008;48:646-654.
 46. Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, et al. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest* 2006;116:2995-3005.
 47. Li J, Tumanut C, Gavigan JA, et al. Secreted PCSK9 promotes LDL receptor degradation independently of proteolytic activity. *Biochem J* 2007;406:203-207.
 48. Huijgen R, Boekholdt SM, Arsenault BJ, et al. Plasma PCSK9 levels and clinical outcomes in the treating to new targets trial: a nested case-control study. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:1778-1784.
 49. Lambert G, Jarnoux AL, Pineau T, et al. Fasting induces hyperlipidemia in mice overexpressing proprotein convertase subtilisin kexin type 9: lack of modulation of very-low-density-lipoprotein hepatic output by the low-density lipoprotein receptor. *Endocrinology* 2006;147:4985-4995.
 50. Jeong HJ, Lee HS, Kim KS, et al. Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2. *J Lipid Res* 2008;49:399-409.
 51. Careskey HE, Davis RA, Alborn WE, et al. Atorvastatin increases human serum levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Lipid Res* 2008;49:394-398.
 52. Zhao Z, Tuakli-Wosornu Y, Lagace TA, et al. Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *Am J Hum Genet* 2006;79:514-523.
 53. Hooper AJ, Marais AD, Tanyanyiwa DM, et al. The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population. *Atherosclerosis* 2007;193:445-448.
 54. 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;48:763-767.
 55. Shan L, Pang L, Zhang R, et al. PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;375:69-73.
 56. Duff CJ, Scott MJ, Kirby IT, et al. Antibody-mediated disruption of the interaction between PCSK9 and the low-density lipoprotein receptor. *Biochem J* 2009;419:577-584.
 57. Bergeron R, Ren JM, Cadman KS, et al. Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281:E1340-E1346.
 58. Holmes BF, Kurth/Kraczek EJ, Winder WW. Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases Glut-4, hexokinase and glycogen in muscle. *J Appl Physiol* 1999;87:1990-1995.
 59. Ojuka EO, Jones TE, Nolte LA, et al. Regulation of Glut-4 biogenesis in muscle: evidence for involvement of AMPK and calcium(2+). *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:E1008-E1013.
 60. Pinkosky SL, Filippov S, Srivastava RA, et al. AMP-activated protein kinase and ATP-citrate lyase are two distinct molecular targets for ETC-1002, a novel small molecule regulator of lipid and carbohydrate metabolism. *J Lipid Res* 2013;54:134-151.

61. Srivastava RA, Hurley TR, Brant AF, et al. A novel small molecule ETC-1002, lowers proatherogenic lipoproteins, reduces adiposity, and improves hepatic steatosis in a hyperlipidemic hamster model (abstr 25085). Presented at: American Heart Association Scientific Sessions 2011; November 12–16, 2011; Orlando, FL.
62. Cramer CT, Goetz B, Hopson KL, et al. Effects of a novel dual lipid synthesis inhibitor and its potential utility in treating dyslipidemia and metabolic syndrome. *J Lipid Res* 2004;45:1289–1301.
63. Ballantyne ChM, Davidson MH, MacDougal DE, et al. Efficacy and safety of a Novel Dual Modulator of Adenosine Triphosphate - Citrate Lyase and Adenosine Monophosphate - Activated Protein Kinase in Patients with Hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:1154–1162.
64. Degoma EM, Rader DJ. Novel HDL-directed pharmacotherapeutic strategies. *Nat Rev Cardiol* 2011;8:266–277.
65. Khera AV, Rader DJ. Future therapeutic directions in reverse cholesterol transport. *Curr Atheroscler Rep* 2010;12:73–81.
66. Rye KA, Bursil CA, Lambert G, et al. The metabolism and antiatherogenic properties of HDL. *J Lipid Res* 2009;50(Suppl):S195–S200.
67. Rayner KJ, Esau CC, Hussain FN, et al. Inhibition of miR-33a/b in nonhuman primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature* 2011;478:404–407.
68. Klerkx AH, El Harchaoui K, van der Steeg WA, et al. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibition beyond raising high-density lipoprotein cholesterol levels: pathways by which modulation of CETP activity may alter atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:706–715.
69. Niesor EJ, Magg C, Ogawa N, et al. Modulating cholesteryl ester transfer protein activity maintains efficient prebeta-HDL formation and increases reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 2010;51:3443–3454.
70. Von Eckardstein A. Mulling over the odds of CETP inhibition. *Eur Heart J* 2010;31:390–393.
71. Weissglas-Volkov D, Pajukanta P. Genetic causes of high and low serum HDL-cholesterol. *J Lipid Res* 2010;51:2032–2057.
72. Gotto AM, Jennifer E, Moon A. Safety of inhibition of cholesteryl ester transfer protein with anacetrapib: the DEFINE study. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2012;10:955–963.
73. Gutstein DE, R Krishna L, Johns D, et al. Anacetrapib, a Novel CETP Inhibitor: Pursuing a New Approach to Cardiovascular Risk Reduction. *Clin pharmacol and therapeutics* 2012;91:109–122.
74. Protocol IIV-MC-EIAN Assessment of Clinical Effects of Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition with Evacetrapib in Patients at High/Risk for vascular Outcomes - the ACCELERATE Study.
75. Yvan-Charvet L, Kling J, Pagler T, et al. Cholesterol efflux potential and antiinflammatory properties of high-density lipoprotein after treatment with niacin or anacetrapib. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:1430–1438.
76. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, et al. Lipoprotein (a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J* 2010;31:2844–2853.
77. Kolski B, Tsimikas S. Emerging therapeutic agents to lower lipoprotein (a) levels. *Curr Opin Lipidol* 2012;23:560–568.
78. Stein EA, Mellis S, Yancopoulos GD, et al. Effect of a monoclonal antibody to PCSK9 on LDL cholesterol. *N Engl J Med* 2012;366:1108–1118.