



Kandidaatintutkielma

Inklisiraani

Metti Rantahalvari

Sisällysluettelo

Käytetyt lyhenteet

Sisällys

1. Dyslipidemia	3
2. PCSK9	3
2.1. PCSK9 rakenne ja toiminta	4
<i>2.1.1 PCSK9 ja LDL-reseptori</i>	5
3. Inklisiraanin kehityspolku	6
3.1. Inklisiraanille myyntilupa	6
4. Inklisiraanin farmakologia	7
4.1 Farmakodynamiikka	7
4.2 Farmakokinetiikka	8
<i>4.2.1 Imeytyminen ja jakautuminen</i>	8
<i>4.2.2 Metabolia ja eliminaatio</i>	9
5. Inklisiraanin rakenne	10
5.1. Inklisiraani-molekyyli	11
<i>5.1.1 GalNAc</i>	11
<i>5.1.2 Nukleotidien modifikaatio</i>	12
6. Muut PCSK9:n kohdistuvat hoitomuodot	13
6.1 Alirokumabi	13
6.2. Evolokumabi	14
6.3. Monoklonaaliset vasta-aineet verrattuna inklisiraaniin	14
7. Kirjallisuusviitteet	16

Käytetyt lyhenteet

AUC	Kokonaisaltistus
ASGPR	Asialoglykoproteiinireseptori
CL _R	Munuaispuhdistuma
C _{max}	Korkein pitoisuus
EGF-A	Epidermaalinen kasvutekijä A
EMA	Euroopan Unionin lääkeviranomainen
FDA	Yhdysvaltain lääkeviranomainen
GalNAc	N-asetyyliagalaktosamiini
HDL	Korkea tiheyksinen rasvaproteiini
IDL	Keskityiheyksinen rasvaproteiini
LDL	Pienitiheyksinen rasvaproteiini
PCSK9	Proteiini-konvertaasi-subtilisiini/keksiini tyyppi 9
RISC	RNA:n indusoima vaientamiskompleksi
siRNA	inhiboiva RNA-molekyyl
SRE	Sterolien säätelyelementti
TLR7	Tollin kaltainen reseptori 7
T _{max}	Korkeinta pitoisuutta vastaava aika
VLDL	Hyvin pienitiheyksinen rasvaproteiini

1. Dyslipidemia

Dyslipidemia on rasva-aineenvaihdunnan häiriötila, jossa veren rasva-aineiden määrä poikkeaa tavoitearvoista (Lääketieteen sanasto, 2021). Dyslipidemia on väestötasolla yleinen ja vuonna 2017 tehdyn FinTerveys 2017 -tutkimuksen aineistossa noin puolella yli 30-vuotiaasta täyttyi dyslipidemian määritelmä (Koponen et al., 2018). Dyslipidemia määritellään Käypä hoito -suosituksen mukaan tilaksi jossa LDL-kolesterolipitoisuus on yli 3,0 mmol/l, triglyseridipitoisuus on yli 1,7 mmol/l tai HDL-kolesterolipitoisuus on alle 1,0 mmol/l miehillä ja naisilla alle 1,2 mmol/l. Dyslipidemia diagnosoidaan vähintään kahtena eri päivänä otetun plasmanäytteen kokonaiskolesteroli-, HDL-kolesteroli-, LDL-kolesteroli- ja tryglyseripitoisuuden perusteella (Dyslipidemiat: Käypä hoito -suositus, 2021). Hyperkolesterolemia on kaikkein yleisin dyslipidemian muoto ja sillä tarkoitetaan veren tavoitearvoja suurempaa kolesterolipitoisuutta. Hyperkolesterolemian perinnöllinen tyyppi on familiarinen hyperkolesterolemia, missä kolesteroliaineenvaihdunta on häiriintynyt ja sen seurauksena näillä henkilöillä havaitaan poikkeuksellisen suuria veren kolesterolipitoisuuksia jo nuorella iällä (Strandberg & Vanhanen, 2021; Lääketieteen sanasto, 2021). Hyperkolesterolemia ja erityisesti korkea LDL-kolesterolin pitoisuus on yhdistetty suurentuneeseen ateroskleroottisten kardiovaskulaarisairauksien, kuten iskeemisen aivoinfarktin, riskiin (FERENCE et al. 2017). Dyslipidemioita hoidetaan ensisijaisesti elämäntapahoidolla, lääkehoitoon siirrytään kun elämäntapamuutoksilla ei saada riittävää vastetta. Lääkehoito koostuu tyypillisesti statiineista, mihin tarvittaessa yhdistetään etsetimibi, PCSK9:n estäjä tai fibraatti dyslipidemiatyypistä riippuen. Statiinien käytöstä on eniten tutkittua dataa, mutta kaikilta potilailta ei saada statiineilla laskettua LDL-kolesterolin tasoa tavoitteiden mukaisesti ja näillä potilailla käytetään eri mekanismeilla vaikuttavia lääkkeitä (Dyslipidemiat: Käypä hoito -suositus, 2021).

2. PCSK9

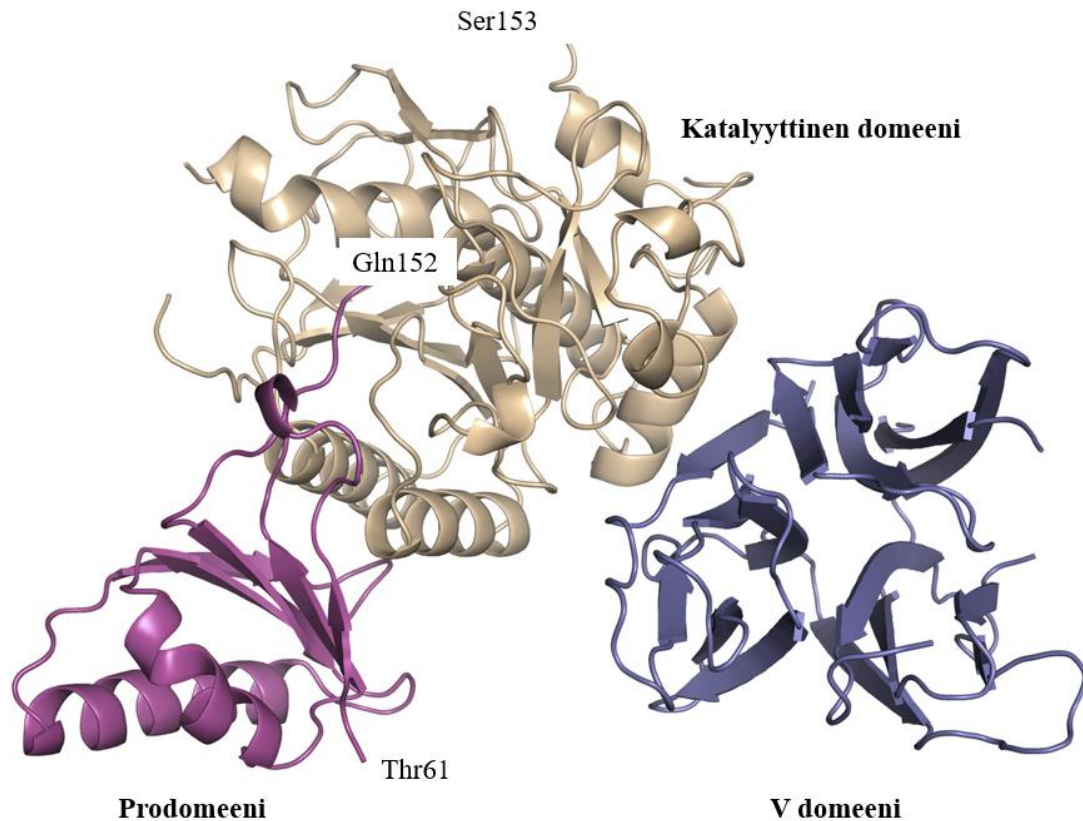
Lipoproteiinit kuljettavat elimistön rasva-aineita kudoksien välillä ja ne luokitellaan tiheyden mukaan hyvin matalatiheyksisiin, VLDL, keskitiheyksisiin, IDL, pienitiheyksisiin, LDL, ja korkeatiheyksisiin, HDL, rasvaproteiineihin. LDL-partikkelit vastaavat pääasiassa kolesterolin kuljetuksesta kudoksiin ja HDL-partikkelit kolesterolin palaamisesta maksaan, mistä se päätyy osaksi synteesiä tai eritettäväksi sapen mukana ohutsuoleen (Mathews et al. 2013). Prooteiini-konvertaasi-subtilisiini/keksiini tyyppi 9, PCSK9, säätelee elimistössä LDL-

kolesterolin tasapainoa sitoutumalla LDL-reseptoreihin ja edistämällä niiden hajotusta (Rahman & Chaudhary, 2019). LDL-reseptorit ovat vastuussa LDL-partikkelien permeoitumisesta soluihin ja reseptorien määrän kasvu on yhteydessä veren LDL-kolesterolin laskuun (Schneider, 2016). Toisaalta LDL-pitoisuudet elimistössä säätelevät PCSK9:n määrää. Kun soluissa on vähän kolesterolia PCSK9:ää syntetisoidaan vähemmän. Geenin sääätelyalueella on sterolien sääteleylementti, SRE, ja sterolien korkea pitoisuus solussa vaikuttaa lisäksi PCSK9:n transkriptiota, jolloin LDL:n soluun otto vähenee (Jeong et al. 2008). PCSK9:n lisääntynyttä aktiivisuutta aiheuttavat geenimutaatiot on kolmas löydetty syy familiarista hyperkolesterolemian takana, *ldlr* ja *apob*-geenien mutaatioiden lisäksi, sillä vähäinen LDL-reseptoreiden määrä solukalvolla estää tehokasta LDL-partikkelien poistumista verenkierrosta. Toimivan PCSK9:n puutteen on havaittu johtavan hypokolesterolemiaan, eli matalaan kolesterolipitoisuuteen veressä, minkä vuoksi PCSK9:hon kohdistuvia hoitomuotoja kehitetään jatkuvasti (Seidah, 2013).

2.1. PCSK9 rakenne ja toiminta

PCSK9 kuuluu seriiniproteaaseihin, tarkemmin prohormone-proproteiin konvertaasi subtilisiinien perheeseen, ja koostuu 692 aminohaposta. Se syntetisoidaan proproteiinina ja endoplasmisessa solukalvostossa siitä muokataan eritettävä 65 kDa entsyymi. PCSK9:n rakenteessa on aminohappojen 153-447 muodostama prodomeeni, joka toimii molekyylin sisäisenä saperonina. Prodomeeni koostuu kahdesta α -heliksistä ja neljän vastakkaiseen suuntaan asettuneen aminohappoketjun muodostamasta β -laskoksesta. Kolmiulotteisen rakenteen muodostumisen kannalta on tärkeää prodomeenin oikea laskostuminen, jonka jälkeen se toimii saperonina katalyyttisen domeenin muodostumiselle. Prodomeeni katkaistaan aminohappoketjusta, mutta se jää molekyylien välisillä sidoksilla inhihoimaan entsyymin toimintaa. PCSK9 ilmentyy maksassa, munuaisissa, pikkuaivoissa ja ohutsuolessa (Fu et al. 2000; Piper et al. 2007; Seidah et al. 2003). PCSK9:n katalyyttinen domeeni koostuu seitsemän yhdensuuntaisen aminohappoketujun muodostamasta β -laskoksesta, jota molemmin puolin ympäröi α -heliksit (Piper et al. 2007). Seriiniproteaaseille on tyypillinen katalyyttinen aminohappojen kolmikko joka koostuu nukleofiilistä, emäksestä ja haposta, PCSK9:ssä tämä kolmikko on Asp186-His226-Ser386 (Mathews et al. 2013; Piper et al. 2007; Seidah et al. 2003). PCSK9:n molekyyli rakenne sisältää myös ns V domeenin, jonka oikea laskostuminen on välttämätön PCSK9:n erittymiselle solusta. V domeeni muodostuu kolmesta symmetrisestä rakenteesta ja sisältää paljon histidiiniä. C-terminaalinen V domeenin on arveltu vastaan

PCSK9:n proteiinien välisistä interaktioista (Piper et al. 2007). PCSK9:n rakenne on esitetty **kuvassa 1**.



Kuva 1 PCSK9:n rakenne. PCSK9 koostuu kolmesta domeenista, katalyyttisestä, inhiboivasta prodomeenista ja proteiinien välisistä interaktioista vastaavasta V domeenista. Suomennettu lähteestä (Piper et al. 2007).

2.1.1 PCSK9 ja LDL-reseptori

Ekstrasellulaarisen PCSK9:n sitoutuminen LDL-reseptoriin saa sen ohjautumaan endosomien kautta lysosomeihin klatriinivälitteisellä endosytoosilla (Nassoury et al. 2007; Zhang et al. 2007). PCSK9 voi sitoutua LDL-reseptoriin myös solun sisäisesti ja siirtää sen trans-Golgista endosomeihin hajotettavaksi (Poirier et al. 2009). PCSK9 sitoutuu pääasiassa epidermaaliseen kasvutekijä A domeeniin, EGF-A, LDL-reseptoria ja sen positiivisesti varautunut C-terminaalinen pää vuorovaikuttaa LDL-reseptorien negatiivisesti varautuneiden ligandia sitovien rakenteiden kanssa (Deng et al. 2019; Zhang et al. 2007). Ligandia sitovien osien rakenteet koostuvat kysteiniirikkaista toistojaksoista ja rakenteen fysiologisia ligandeja ovat

apolipoproteiini E VLDL-partikkelista ja LDL-partikkelin apolipoproteiini B (Russell et al. 1989).

3. Inklisiraanin kehityspolku

Vuonna 2003 tutkimusryhmä löysi 12,5 % tutkituista autosomaalista familiaalista hypokolestrolemiaa sairastavien genomista gain-of-function, eli proteiinin aktiivisuutta parantavia, mutatioita *Pcsk9*-geenissä (Abifadel et al. 2003). Aktiivisuutta parantavia löydöksiä seurasi loss-of-function mutaatioiden löytyminen, eli PCSK9:n geenin mutaatiot joiden myötä PCSK9:n aktiivisuus on vähäisempi ja siten LDL-pitoisuudet pysyvät näillä henkilöillä matalana. On myös osoitettu knockout-hiirillä, PCSK9:n synteessin puutteen aiheuttavan hypokolesterolemiaa, sillä LDL-reseptorien määrä kasvaa. Vastaavasti liian aktiivinen PCSK9:n tuotanto nostaa veren LDL-kolesterolipitoisuutta (Kotowski et al. 2006; Rashid et al. 2005). Lääkekehityksen ensimmäiset sovellutukset ovat olleet PCSK9:n monoklonaaliset vastaaineet, jotka sitoutuvat PCSK9:n katalyyttiseen domeeniin estäen sen toiminnan ja veren LDL-kolesterolipitoisuus laskee (Chan et al. 2009a). PCSK9-estäjät evolokumabi ja alirokumabi ovat saaneet myyntiluvat 2010-luvun puolivälissä (Kahri, 2016). Vuonna 2014 julkaistiin artikkeli pienestä 1. faasin kokeesta, jossa tutkittiin mahdollisuutta siRNA:n avulla inhiboida PCSK9:n tuotantoa, joka antoi lupaavia tuloksia LDL-kolesterolin laskusta vaikka tutkimuksen voimaluku olikin riittämätön (Fitzgerald et al. 2014). Vuoden 2020 lopussa inklisiraani, PCSK9:n tuotantoa inhiboiva siRNA, sai myyntiluvan Euroopassa (EMA, 2020a).

3.1. Inklisiraanille myyntilupa

Vuoden 2020 joulukuussa Euroopan Unionin lääkeviranomaisen, EMA, hyväksyi inklisiraanille myyntiluvan Euroopassa aikuisten primaarisen hyperkolesterolemian tai sekamuotoisen dyslipidemian hoitoon (EMA, 2020a). Inklisiraania käytetään yhdessä statiinien kanssa, tai jos statiinien käyttö on vasta-aiheista, voidaan sitä käyttää myös yksinään (Dyslipidemia, Käypä hoito -suositus, 2021). Inklisiraanin on havaittu olevan kliinisissä tutkimuksissa tehokas LDL-kolesterolin laskija subkutaanisella antoreitillä jopa kuuden kuukauden välein annosteltuna (Lamb, 2021). Inklisiraania myydään Leqvion kauppanimellä ja sen kohdemolekyylillä on PCSK9:n mRNA. Se sai myyntiluvan osoitettuaan muita rasva-aineita vähentäviä lääkkeitä tehokkaammaksi hoidoksi ja hyödyt haittoja suuremmiksi. Tyypillisimpiä haittavaikutuksia ovat pistokohdan ärsytys, kipu ja ihottuma (EMA, 2020b).

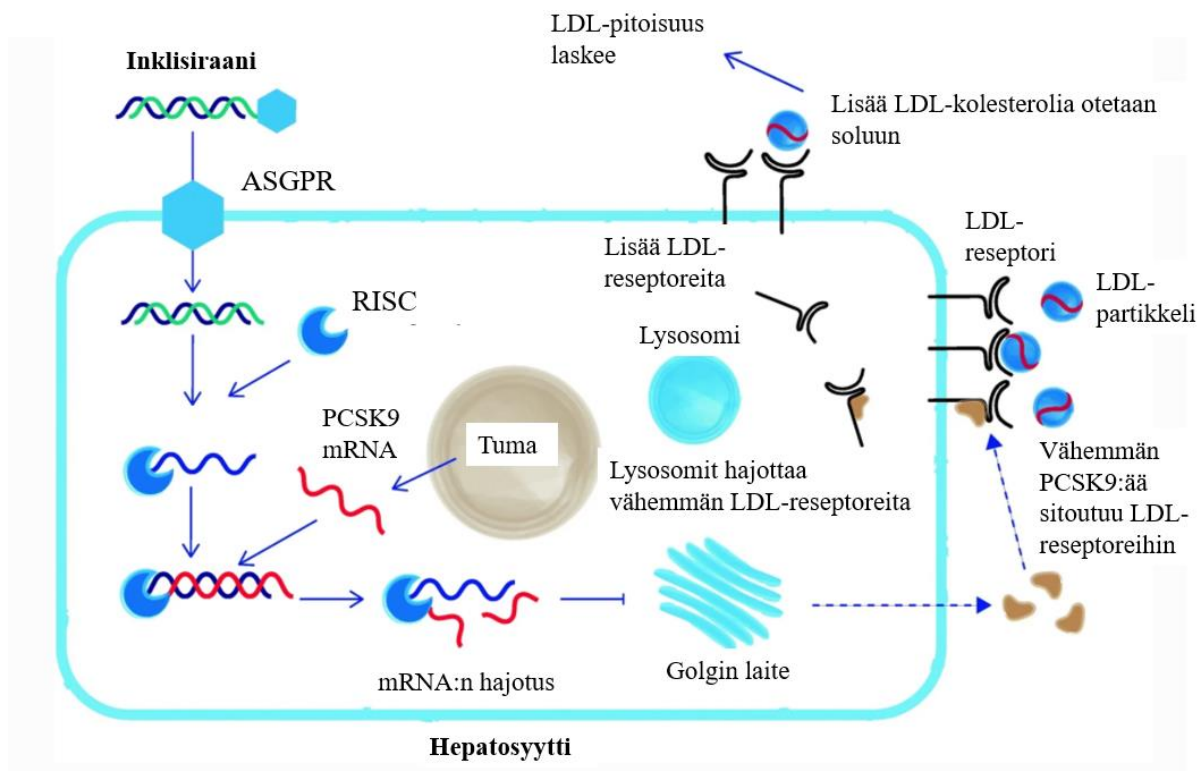
Lokakuun alusta 2021 alkaen Leqvio on ollut sairaskorvauksen peruskorvattava familiaalisen hyperkolesterolemian, hyperkolesterolemian ja sekamuotoisen dyslipidemian hoidossa (Kela, 2021). Inklusiraani on nopeasti löytänyt tiensä eri maiden hoitosuosituksiin ja sitä onkin kritisoitu, sillä inklusiraanin pitkäaikaiskäytöstä tai lääkkeen kardiovaskulaarihyödyistä ei ole vielä riittävästi tutkimuksia ja lääke on ns. mustan kolmion lääke, eli se on erityisen tarkkailun alla (Wise, 2021).

4. Inklusiraanin farmakologia

Inklusiraania annostellaan subkutaanisesti 300 mg annos natriumsuolaa, mikä vastaa 284 mg inklusiraania. Ylläpitovaiheessa annostelu tapahtuu 180 päivän välein (EMA, 2020b). Inklusiraani on tehokas LDL-kolesterolin laskija ja sillä ei ole vakavia haittavaikutuksia, yleisimmät haittavaikutukset ovat yskä, päänsärky, selkäkipu, ripuli ja lihassäryt (Fitzgerald et al. 2017) Inklusiraanin immunogeenisyyttä on pyritty vähentämään nukleotidien muokkauksella, nukleotidien 2'-O-metyyli-, 2'fluoro- ja 2'deoksimuokkauksien ansiosta immuunipuolustuksen solut eivät havaitse siRNA:ta ja aiheuta immunogeenistä reaktiota (EMA, 2020b; Sioud et al. 2007).

4.1 Farmakodynamiikka

Yhden annostelun jälkeen on havaittu 48-59 % vähennys PCSK9:n määrissä. Toisen annostelun jälkeen vähennys oli 67-73 %. 180 päivää annostelun jälkeen yhdellä annoksella LDL-kolesterolin määrä laski 36-40 % ja kahdella annostelulla 51-58 %. (EMA, 2020; Wright et al. 2019). Solussa siRNA pariutuu mRNA:n kanssa emäsekvenssin perusteella, jonka seurauksena solun sisäinen puolustusmekanismi eli RNA:n indusoima vaientamiskompleksi, RISC, muodostuu. RISC koostuu useista molekyyleistä, joiden tehtävä on pilkkoa mRNA tai estää sen translaatio. Pilkkomisesta vastaa argonauttiproteiinien perheeseen kuuluva proteiini, jonka uurteessa siRNA pilkotaan. MRNA:n hajottua proteiinin translaatio estyy (Kaczmarek et al. 2017; Song et al. 2004). SiRNA välitteinen PCSK9:n synteesin estäminen alentaa LDL-kolesterolia vähentämällä LDL-reseptoreiden hajotusta. Yksi RISC:n ja siRNA:n muodostama kompleksi voi pilkkoa useita mRNA:ta, joten siRNA:n vaikutus on kestävä (Fitzgerald et al. 2017). Inklusiraanin vaikutusmekanismi on esitetty **kuvassa 2**.



Kuva 2 Inklusiraanin vaikutusmekanismi. Inklusiraani otetaan hepatosyyttiin sisään asialoglykoproteiinireseptorin, ASGPR, kautta. Solussa inklisiraani ja RISC muodostavat kompleksin, missä antisensejuoste pariutuu PCSK9:n mRNA:n kanssa. MRNA hajotetaan, PCSK9:n synteesi vähenee ja siten vähemmän PCSK9:ää sitoutuu LDL-reseptoreihin. LDL-reseptoreiden määrä kasvaa solukalvolla, sillä lysosomit hajottavat vähemmän LDL-reseptoreita ja LDL-kolesterolia otetaan enemmän soluun. LDL-kolesterolin pitoisuus verenkierrossa laskee. Käännetty (Hardy et al. 2021) artikkelista.

4.2 Farmakokinetiikka

Inklusiraani noudattaa lineaarista farmakokinetiikkaa annostelulla 25-800 mg (EMA, 2020b).

4.2.1 Imeytyminen ja jakautuminen

Inklusiraanin kuljetuksesta hepatosyytteihin vastaa asialoglykoproteiinireseptori, ASGPR, joita on runsaasti hepatosyyteissä ja se kuljettaa terminaalisen glalaktosin sisältäviä glykoproteiineja. ASGPR-reseptori ja glykoproteiini otetaan hepatosyyttiin klatriinivälitteisellä endosytoosilla, jonka jälkeen reseptori voidaan kierrättää uudelleen käyttöön. Inklusiraaniin on konjugoitu N-asetyyliGalNAc, jolla on pyritty parantamaan lääkkeen

kudosselektiivisyyttä. ASPGPR-reseptorien suuri affiniteetti GalNAc:lle ja nopea kulkeutuminen hepatosyytteihin voi vähentää inkliisiraanin off-target sitoutumista. SiRNA-GalNAc-konjugaateille on tutkittu hiirillä jakautumista hepatosyytteihin eri antoreittejä vertaillen. Subkutaanisena antona C_{\max} saavutettiin 70 minuutissa ja intravenoosina antona 30 minuutissa (EMA, 2020b; Nair et al. 2014; Steirer et al. 2009; Ashwell & Harford, 1982). Maksassa havaitaan suurempia pitoisuuksia subkutaanista antoreittiä käyttäen, sillä hidas imeytyminen antoreitiltä on eduksi hepatosyytteihin permeoitumiselle (Nair et al. 2014). Inkliisiraanin 1. faasin tutkimuksissa sille määritettiin plasman korkeimmaksi pitoisuudeksi, C_{\max} , 421 ± 137 ng/ml joka saavutettiin neljän tunnin kuluttua injektioinnista, T_{\max} on siis noin 4 h (Wright et al. 2019). Inkliisiraanilla on vain noin 5-10 tunnin puoliintumisaika plasmassa ja noin 87 % inkliisiraanista sitoutuu plasman proteiineihin, mikä on oligonukleotideille hyvin tyypillistä. 48 tuntia inkliisiraanin subkutaanista annostelusta inkliisiraania ei ole enää havaittavissa verenkierrossa ja arviolta 83 % inkliisiraanista otetaan hepatosyytteihin. Korkeimmat pitoisuudet ja altistukset inkliisiraanille havaitaan maksassa ja munuaisissa eliminaatioreitin ja GalNAc-konjugoinnin vuoksi. Jakautumistilavuus inkliisiraanille on noin 500 l, eli tilavuus joka saadaan jakamalla annettu määrä mitatulla konsentraatiolla (Lääketieteen sanasto, 2021; EMA, 2020b; Wright et al. 2019; Nair et al. 2014; Geselowitz & Neckers, 2009).

4.2.2 Metabolia ja eliminaatio

Pienimolekyylisille lääkkeille on tyypillisiä sytokromi P450 isoformien kautta erilaiset yhteisvaikutukset, sillä ne ovat näiden isoformien indusoia tai inhibiittoreita (Turpeinen & Hakkola, 2019). Inkliisiraani ei ole sytokromi P450 substraatti, joten sillä ei ole sen kautta yhteisvaikutuksia mihin lääkkeisiin eivätkä nämä entsyymit metaboloivat inkliisiraania. Inkliisiraanien eliminaatio tapahtuu kuten endogeenisten nukleiinihappojen, inkliisiraania pilkkovat nukleaasit soluissa pienemmiksi molekyyleiksi (EMA, 2020b). Nukleaasien toimintaa on pyritty estämään korvaamalla inkliisiraanin RNA-rakenteesta fosforiesterin yksi happi rikillä, mikä pidentää inkliisiraanin puoliintumisaikaa 5-10 tuntiin. (EMA, 2020b; Rahman et al. 2012). Inkliisiraanin metaboliitit poistuvat pääasiassa munuaispuhdistumana, eli ne eritetään virtsaan, ja noin 16 % inkliisiraanista eritetään muuttumattomana. Munuaispuhdistuma, CL_R , inkliisiraanille on 5.6 ± 1.3 l/h ja kokonaispuhdistuma, eli paljonko lääkeainetta puhdistuu plasmasta tietyssä ajassa, on 38.1 l/h. Munuaispuhdistuma heikkenee lineaarisesti munuaisten vajaatoiminnan myötä, johtaen kasvaneeseen kokonaisaltistukseen,

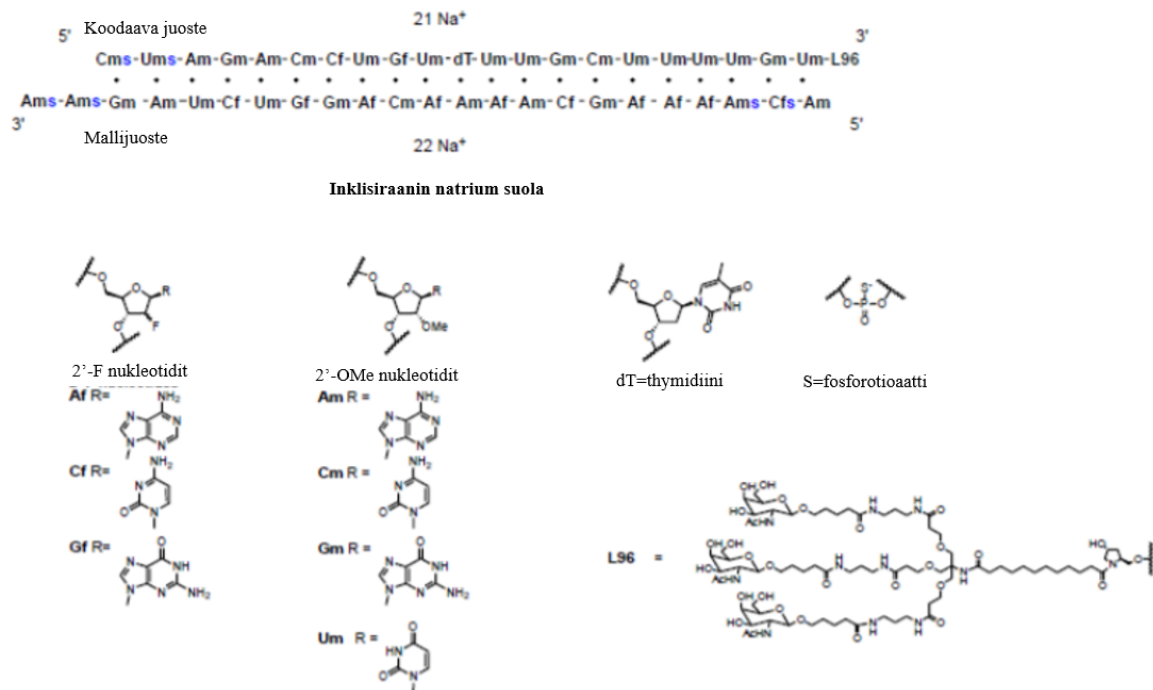
AUC, mikä pitää huomioida annostuksessa munuaisten vajaatoimita sairastavilla. Normaalilla munuaisfunktiolla AUC inkliisiraanille on 7890 ± 1780 hng/ml (EMA 2020b; Lääketieteen sanasto, 2021; Wright et al. 2019).

5. Inkliisiraanin rakenne

Viime vuosina lääkemarkkinoille on tullut entistä enemmän ns. ATMP-tuotteita eli pitkälle kehitettyjen terapioiden lääkkeitä. Näiden piiriin luokitellaan erilaiset geeniterapiavalmisteet, kudosuokkaustuotteet ja soluterapiavalmisteet. Geeniterapiatuotteiden alle on kehittynyt nousevana lääkeryhmänä oligonukleoidiläkkeet, joista erityisesti inhiboivia RNA-molekyylejä, siRNA:ita, kehitetään vilkkaasti (Honkakoski & Urtti, 2021). Näiden etuna on hyvin selektiivinen kohteeseen sitoutuminen ja harva annostelu. Jopa neljästi vuodessa voi olla riittävä annostelu siRNA-läkkeelle. SiRNA -molekyyleillä pyritään estämään tai vähentämään geenituotteita ja niitä käytetäänkin hoitomuotona useissa sairauksissa joissa taustalla on liian aktiivinen proteiini. SiRNA sitoutuu kohde lähetti-RNA:han Watson-Crick periatteen mukaisesti sen nukleinihapposekvenssin perusteella, jolloin lähetti-RNA hajotetaan tai translaatio estyy. Sitoutumistapa tarjoaa selkeän edun siRNA-läkkeille: sitoutuminen ei vaadi tiettyä konformaatiota kohdemolekyyliltä. Pieni molekyyliset läkkeet ja proteiiniläkkeet vaativat tietyn aktiivisen kohdan kohdemolekyyliltään jotta ne voivat sitoutua siihen ja vuorovaikuttaa sen kanssa. SiRNA-läkkeiden kehityksen haasteita ovat RNA molekyylin herkkä harjoaminen RNA:ta hajottavien RNAasien läsnäollessa ja heikko permeoituminen erilaisten solujen välisten esteiden läpi. SiRNA-molekyylejä muokataan, jotta niiden säilyvyyttä ja permeabiliteettia saadaan parannettua, lisäämällä esim. O-metyyli-ryhmiä hydroksi-ryhmän tilalle ja muuten modifioimalla nukleotidin rakennetta. Molekyylin neutraali pinta estää epätarkoituksen mukaista proteiineihin sitoutumista ja erilaisilla konjugaateilla siRNA molekyyli saadaan paremmin kohdennettua kohteeseensa. Sellaisenaan siRNA olisi eliminaatiolle hyvin altis, sillä sen koko on riittävän pieni eritettäväksi virtsaan, mutta oikean konjugaation ansiosta voidaan välttyä tältä ja puoliintumisaika pitenee. Tyypillisiä konjugaatteja ovat hiilihydraatit, peptidit ja vasta-aineet. Näiden ansiosta jo pienillä annoksilla lääkettä saadaan riittävä vaikutus (Hu et al. 2020). Ensimmäinen Yhdysvaltain lääkeviranomaisen, FDA:n, hyväksynnän saanut siRNA-lääke on patisiraani letaaliin perinnöllisen amyloidipolyneuropatian hoitoon vuonna 2018. Patisiraanin jälkeen hyväksynnän ovat saaneet givosiraani, lumasiraani ja viimeisimpänä inkliisiraani (FDA, 2021).

5.1. Inklisiraani-molekyyli

Inklisiraani on kemiallisesti modifioitu ja syntetisoitu kaksijuosteinen 21-23 nukleotidin siRNA johon on konjugoitu L96, mikä koostuu N-asetyyलगalaktoosiamiinista, GalNAc, ja trans-4-hydroksi-L-proliinimetyyliesteristä. Leqvio valmistuksessa inklisiraani on natriumsuolana, jonka rakenne on esitetty **kuvassa 3**. Lisäksi inklisiraanin nukleotidejä on muokattu lisäämällä fluori, fosforotioaatti tai O-metyyli 2' modifikaationa. Inklisiraanin liukoisuus veteen on ainakin 300 mg/ml ja se on hyvin polaarinen yhdiste johtuen sen nukleiinihapporakenteesta. Inklisiraanin molekyylipaino on 17284,75 g/mol (EMA, 2020b).



Kuva 3 Inklisiraanin natrium suola ja muokattujen molekyylien rakenne. Käännetty EMA:n julkaisusta (EMA, 2020b).

5.1.1 GalNAc

Si-RNA:t ovat tehokkaita inhiboimaan solujen proteiinisynteesiä, mutta niiden kohdentaminen oikeaan kohteeseensa on ollut haaste. Näitä haasteita on pyritty ratkaisemaan eri keinoin, kuten lipidinanopartikkeleilla. Lipidi-konjukoidut siRNA:t permeoituvat tehokkaasti eri kudoksiin, mutta kudosselektiivisyys on vähäistä ja geenien hiljentämistä tapahtuu myös kohteen ulkopuolella (Wolfrum et al. 2007). Maksassa on runsaasti ASGP-reseptoreita, jotka kuljettavat

hepatosyytteihin hiilihydraatteja joilla on rakenteessa terminaalinen galaktoosi. Erityisesti ASGP-reseptori kuljettaa GalNAc-rakenteisia glykoproteiineja, sillä ASGP-reseptorilla on erityisen suuri affiniteetti näille, jopa 100-kertainen verrattuna joihinkin muihin galaktoositerminaalisiin glykoproteiineihin (Steirer et al. 2009; Ashwell & Harford, 1982). GalNAc-konjugaatteja on kaksihaaraisina ja kolmihaaraisiana, näistä kolmihaaraisen on osoitettu siirtyvän paremmin hepatosyytteihin. GalNAc-konjugaation permeaation on osoitettu olevan Ca^{2+} -ioneista riippuvaista, sillä kalsiumia sitovan EGTA:n läsnäollessa soluun otto väheni merkittävästi. Konjugaation on osoitettu myös lisäävän hepatosyytteihin kulkeutumista merkittävästi ja sen etu on subkutaanisen antoreitin mahdollistaminen (Nair et al. 2014).

5.1.2 Nukleotidien modifikaatio

Inklisiraanin nukleotidien ribooseja on modifioitu korvaamalla 2'-OH 2'-O-metyyllillä, sytosiinia, guaniinia ja adeniinia on muokattu riboosin 2'-OH:n korvaamisella fluorilla ja fosfaatin rakennetta on muokattu korvaamalla yksi fosfori rikillä, jolloin syntyy fosforotioaatti (EMA, 2020b). 2'-O-metylaatiolla on immunosuppressiivisia vaikutuksia RNA-molekyylin sekvenssistä riippumatta. Immuunipuolustus tunnistaa keholle vieraita RNA-molekyylejä Tollin kaltaisella reseptorilla 7, TLR7, tunnistettuaan vieraan RNA:n immuunipuolustuksen solut alkavat erittää sytokiinejä jotka saavat aikaan tulehdusreaktion. O-metylaatio riboosissa estää TLR7:n toimintaa ja siten solun signaalintiketjua johtaen immunosuppressioon (Rimbach et al. 2015; Robbins et al. 2007). 2'-O-metylaatiolla on immunosuppression lisäksi nukleaaseilta suojaava vaikutus, kuten myös fosfaatin rakenteen muokkaus fosforotioaatiksi (Monia et al., 1996). 2'-OH:n korvaaminen fluorilla pidentää molekyylin puoliintumisaikaa huomattavasti ja suojaa sitä nukleaaseilta. 2'-OH siRNA hajoaa plasmaan päästyään hyvin nopeasti eli minuuteissa, mutta 2'-F-muokatut siRNA:t säilyvät verenkierrossa jopa yli kaksi vuorokautta (Layzer et al. 2004). 2'-F-nukleotidit siRNA:n rakenteessa lisäävät molekyylin lämpöstabiiliutta, sulamispiste nousee noin 1°C yhtä 2'-F-nukleotidia kohden. RISC-rakenteen muodostumisen kannalta lämpöstabiiliuden muutoksilla voi olla merkitystä, sillä RISC:n sitoutuminen siRNA:han riippuu juosteiden 5'-päiden termodynaamisesta vakaudesta. Matalamman vakauden omaava juoste muodostaa kompleksin, mikä on huomioitava siRNA:n rakennemuokkausten suunnittelussa jotta kompleksilla on haluttu aktiivisuus. 2'-F ja 2'-O-metylaation vuorottelu nukleotideissä vaikuttaa olevan optimaalinen hyvän termodynaamisen vakauden ja aktiivisuuden kannalta (Allerson et al. 2005).

6. Muut PCSK9:n kohdistuvat hoitomuodot

Ensisijainen lääkehoito hyperkolesterolemiaan on HMG-CoA-reduktaasia ja siten kolesterolin synteesiä estävät statiinit. Kuitenkin joillekin ryhmille statiineilla ei saada riittävää hoitovastetta ja statiinien ohella tai yksinään käytetään PCSK9:n estäjiä eli evolokumabia ja alirokumabia. Evolokumabi ja alirokumabi ovat monoklonaalisia vasta-aineita ja niiden rinnalle on kehittynyt vaihtoehtoiseksi hoidoksi inkliisiraani (Strandberg & Vanhanen, 2021). PCSK9:n estäjät vaikuttavat sitoutumalla PCSK9-proteiiniin ja estävät siten sen vuorovaikutuksen LDL-reseptorien kanssa. Vasta-aineen raskas ketju sitoutuu PCSK9:n katalyyttiseen domeeniin useilla vetysidoksilla ja hydrofobisilla vuorovaikutuksilla, kevyen ketjun jäädessä kauemmas. Inhibition seurauksena LDL-reseptoreita hajotetaan vähemmän ja verenkierrosta poistuu enemmän LDL-kolesterolia niiden reseptoreiden kautta. Vasta-aineet vaikuttavat useita viikkoja veren kolesterolitasoon (Page & Watts, 2016; Chan et al. 2009b). Monoklonaalisilla vasta-aineilla hoito on osoittautunut turvalliseksi ja vaikuttavaksi hoitomuodoksi laskemaan LDL-kolesterolia. Evolokumabi ja alirokumabi laskevat yli 50 % LDL-kolesterolipitoisuutta (Navarese et al. 2015; Zhang et al. 2015). Kuitenkin joillain harvoilla ihmisillä PCSK9-estäjät eivät aiheuta LDL-kolesterolin merkittävää laskua. Näiden syiksi on arvioitu potilaiden heikkoa sitoutumista hoitoon, lääkettä vastaan kehittyneitä vasta-aineita ja lääkkeen annosteluun liittyviä seikkoja. Syitä matalamman vaikutuksen takana on haastava arvioida, sillä ne vaatisivat hyvin tarkan asetelman tutkimuksia, joissa sekoittavien tekijöiden määrä olisi hyvin hallittu (Bays et al. 2018). Yleisimmät haittavaikutukset PCSK9:n estäjille ovat nenänielutulehdus ja injektioaikan lievät reaktiot. PCSK9:n estäjien ei ole havaittu aiheuttavan lihassärkyä tai neurokognitiivisiä haittavaikutuksia (Rosenson et al. 2018).

6.1 Alirokumabi

Alirokumabia myydään 150 mg/ml ja 75 mg/ml esitäytetyissä kynissä kauppanimellä Praluent. Alirokumabi on ihmisen IgG1-vasta-aine jota tuotetaan yhdistelmä-DNA-tekniikalla nisäkässoluissa. Alirokumabin käyttöaiheena on aikuisten primaarinen hyperkolesterolemia, sekamuotoinen dyslipidemia tai ateroskleroottinen sydän- ja verisuonitauti. Valmistetta annostellaan kahden viikon välein subkutaanisena pistoksena reiteen, vatsaan tai olkavarteen, aloitusannoksena 75 mg ja hyvin korkean LDL-kolesterolin potilaille 150 mg annoksella (Duodecim lääketietokanta, 2021). Keskimääräinen eliminaation puoliintumisaika

alirokumabille on noin 6-7 päivää yksittäiselle pistokselle, eli tässä ajassa alirokumabin määrä kudoksissa on pienentynyt puoleen. Ihonalaisena pistoksena alirokumabi sitoutuu nopeasti veren PCSK9-molekyyleihin. Pistoksen vaikutukset LDL-kolesterolin pitoisuuteen alkavat näkyä muutamassa päivässä ja huippuvaikutus saavutetaan 8-15 päivässä. Valmisteella ei ole havaittu vakavia haittavaikutuksia (Lunven et al. 2014; Lääketieteen sanasto, 2021).

6.2. Evolokumabi

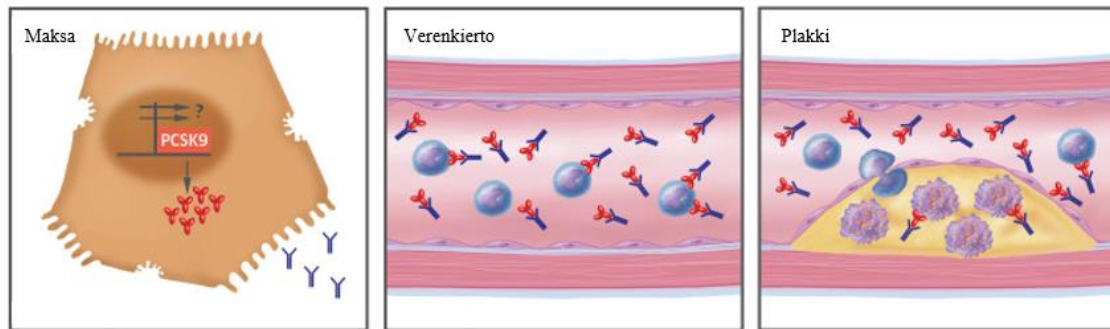
Evolokumabia myydään kauppanimellä Repatha 140 mg/ml liuoksena esitäytetyissä kynissä. Evolokumabi on ihmisen IgG2-vasta-aine ja poikkeaa rakenteellisesti hieman alirokumabista joka on IgG1-vasta-aine (Duodecim lääketietokanta, 2021). IgG1- ja IgG2-vasta-aineilla on yli 90 % homologia ja suurimmat erot sijoittuvat N-terminaaliseen CH2 domeeniin sekä sarana-alueeseen. IgG1-vasta-aineella sarana-alue on 15 aminohappoa ja IgG2-vasta-aineella se on 12 aminohappoa. Pidempi sarana-alue tekee vasta-aineen rakenteesta joustavamman. Rakenteelliset erot johtavat erilaiseen sitoutumiseen kohdemolekyyleihin (Vidarsson et al. 2014). Alirokumabin tavoin evolokumabi tuotetaan nisäkässoluissa yhdistelmä-DNA-menetelmällä. Evolokumabia voidaan käyttää yli 12-vuotiaille homotsygoottisen familiaalisen hyperkolesterolemian hoitoon, aikuisille hyperkolesterolemian, sekamuotoisen dyslipidemian tai ateroskeroottisen sydän- tai verisuonisairauden hoitoon. Lääkettä annostellaan kahden viikon välein 140 mg tai kerran kuukaudessa 420 mg ihon alle injektiona vatsaan, reiteen tai olkavarteen (Duodecim lääketietokanta, 2021). Evolokumabin suurimmat pitoisuudet veressä havaitaan 3-4 päivän aikana annosta ja suurin vaikutus LDL-kolesterolipitoisuuteen 14-21 päivässä. Absoluuttinen hyötyosuus, eli paljonko lääkeaineesta pääsi sitoutumaan kohdemolekyylinsä, evolokumabille on 72% ja puoliintumisaika on 11-17 päivää. Evolokumabin ei ole havaittu olevan immunogeeninen (Kasichayanula et al. 2018; Lääketieteen sanasto, 2021).

6.3. Monoklonaaliset vasta-aineet verrattuna inkliisiraaniin

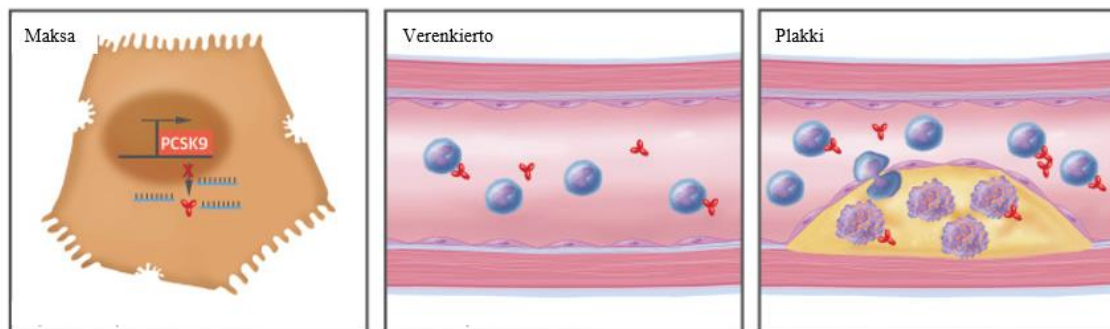
Inkliisiraanin ja PCSK9-estäjien suurin ero on vaikutusmekanismeissa. Inkliisiraani siRNA:na estää PCSK9:n transkription mRNA:sta proteiiniksi ja syntetisoidun proteiinin määrä vähenee. PCSK9-estäjät sitovat PCSK9:n komplekseiksi vasta-aineiden kanssa, minkä seurauksena PCSK9:n synteesi pysyy ennallaan tai jopa kasvaa, mutta se ei pysty sitoutumaan kohteeseensa. Vaikutusmekanismien vertailu on esitetty **kuvas**sa 4. PCSK9-estäjän ja PCSK9:n kompleksin

pitoisuuden on havaittu nousevan elimistössä ajan myötä, minkä syyksi on epäilty kompleksin hitaampaa eliminaatiota. Inklisiraanin etuna on PCSK9:n synteesin estäminen hepatosyyteissä, jolloin elimistölle vierasta kompleksia ei synny (Rosenson et al. 2018). Vuoden 2021 syyskuuhun mennessä on raportoitu ainakin yhdestä IgE-välitteisestä ristiallergiasta alirokumabille ja evolokumabille (Lam et al. 2021).

PCSK9-estäjien vaikutusmekanismi



Inklisiraanin vaikutusmekanismi



Kuva 4 Kuvassa on esitetty PCSK9-estäjien ja inklisiraanin vaikutusmekanismi. PCSK9 syntetisoidaan maksan hepatosyyteissä mistä se eritetään verenkiertoon. Inklisiraani estää hepatosyyteissä PCSK9:n synteesiä, jolloin sen erityksen määrä verenkiertoon vähenee. Verenkierrossa PCSK9-estäjät sitoutuvat PCSK9:n, kompleksien määrä verenkierrossa kasvaa ja PCSK9:n sitoutuminen LDL-reseptoriin estyy. PCSK9-estäjät pystyvät sitoutumaan myös ateroskleroottisessa plakissa PCSK9:n ja estämään sen toimintaa. Inklisiraani vähentää plakkiin kertyvän PCSK9:n määrää, vaikuttamatta sinne jo kertyneeseen PCSK9:n. Mukaelma (Rosenson et al. 2018) kuvasta.

Inklisiraanin pitkäaikaisesta käytöstä ei ole vielä tutkimusnäyttöä, eikä kardiovaskulaarisista hyödyistä, kuten alirokumabille ja evolokumabille (EMA, 2020b). Evolokumabi yhdistettynä statiineihin on havaittu vähentävän 15 % kardiovaskulaaritapahtumia ja 20 % vakavampia

tapahtumia, kuten kuolemia kardiovaskulaarisista (Sabatine et al. 2017). Alorokumabin on osoitettu vähentävän uusiutuvia iskeemisiä kardiovaskulaaritapahtumia noin kolmen vuoden seurannan aikana potilailla joilla oli akuutti kardiovaskulaarisairaus ja statiinilääkitys korkealla annostuksella (Schwartz et al. 2018). Inklisiraanin kardiovaskulaarivaikutuksia tutkitaan ORION-4 -tutkimuksessa, jonka odotetaan valmistuvan 2026 (ClinicalTrials.Gov, 2021) PCSK9-estäjien on osoitettu laskevan LDL-kolesterolia yli 50 % ja inklisiraanin 67-73 % (Kastelein et al. 2015; Santos et al. 2020; Wright et al., 2019.). Inklisiraanin teho LDL-kolesterolin laskussa on siis PCSK9-estäjiä vastaava, mutta annosteluväli huomattavasti harvempi ja siten rasitus injektioinnista pienempi (Ray et al. 2017). ORION-3 -tutkimus joka vertailee evolokumabin ja inklisiraanin tehoa ja turvallisuutta korkean riskin potilailla on meneillään ja sen odotetaan valmistuvan 2023 (ClinicalTrials.Gov, 2022)

7. Kirjallisuusviitteet

- Abifadel, M., Varret, M., Rabès, J. P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., Derré, A., Villéger, L., Farnier, M., Beucler, I., Bruckert, E., Chambaz, J., Chanu, B., Lecerf, J. M., Luc, G., ... Boileau, C. (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nature Genetics* 2003 34:2, 34(2), 154–156. <https://doi.org/10.1038/NG1161>
- Allerson, C. R., Sioufi, N., Jarres, R., Prakash, T. P., Naik, N., Berdeja, A., Wanders, L., Griffey, R. H., Swayze, E. E., & Bhat, B. (2005). Fully 2'-Modified Oligonucleotide Duplexes with Improved in Vitro Potency and Stability Compared to Unmodified Small Interfering RNA. <https://doi.org/10.1021/jm049167j>
- Ashwell, G., & Harford, J. (1982). Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem*, 51:531-54, 10.1146/annurev.bi.51.070182.002531
- Bays, H. E., Rosenson, R. S., Baccara-Dinet, M. T., Louie, M. J., Thompson, D., & Hovingh, G. K. (2018). Assessment of the 1% of Patients with Consistent < 15% Reduction in Low-Density Lipoprotein Cholesterol: Pooled Analysis of 10 Phase 3 ODYSSEY Alirocumab Trials. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 32(2), 175–180. <https://doi.org/10.1007/S10557-018-6784-Z/TABLES/1>
- Chan, J. C. Y., Piper, D. E., Cao, Q., Liu, D., King, C., Wang, W., Tang, J., Liu, Q., Higbee, J., Xia, Z., Di, Y., Shetterly, S., Arimura, Z., Salomonis, H., Romanow, W. G., Thibault, S. T., Zhang, R., Cao, P., Yang, X. P., ... Jackson, S. M. (2009a). A proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 neutralizing antibody reduces serum cholesterol in mice and nonhuman primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(24), 9820–9825. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0903849106>
- Chan, J. C. Y., Piper, D. E., Cao, Q., Liu, D., King, C., Wang, W., Tang, J., Liu, Q., Higbee, J., Xia, Z., Di, Y., Shetterly, S., Arimura, Z., Salomonis, H., Romanow, W. G., Thibault, S. T., Zhang, R., Cao, P., Yang, X. P., ... Jackson, S. M. (2009b). A proprotein convertase

- subtilisin/kexin type 9 neutralizing antibody reduces serum cholesterol in mice and nonhuman primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(24), 9820–9825. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0903849106>
- ClinicalTrials.Gov, An Extension Trial of Inclisiran Compared to Evolocumab in Participants With Cardiovascular Disease and High Cholesterol. (2022). Viitattu 9.2.2022, Saatavilla: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03060577>
- Deng, S. jun, Alabi, A., Gu, H. mei, Adijiang, A., Qin, S., & Zhang, D. wei. (2019). Identification of amino acid residues in the ligand binding repeats of LDL receptor important for PCSK9 binding. *Journal of Lipid Research*, 60(3), 516–527. <https://doi.org/10.1194/JLR.M089193>
- Duodecim lääketietokanta. Viitattu 3.10.2021. Saatavilla: <https://www.terveysportti.fi/apps/laake>
- Dyslipidemiat. Käypä hoito -suositus (2021) Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Sisätautilääkäreiden Yhdistys ry:n asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim. Viitattu 3.10.2021. Saatavilla: www.kaypahoito.fi
- EMA (2020a). Leqvio, INN-inclisiran. Viitattu 30.12.2021, Saatavilla: www.ema.europa.eu/contact
- EMA (2020b). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Assessment report Leqvio. Viitattu 30.12.2021, Saatavilla: www.ema.europa.eu/contact
- FDA (2021) FDA approves add-on therapy to lower cholesterol among certain high-risk adults | FDA. Viitattu 30.12.2021, Saatavilla: <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-add-therapy-lower-cholesterol-among-certain-high-risk-adults>
- Ference, B. A., Ginsberg, H. N., Graham, I., Ray, K. K., Packard, C. J., Bruckert, E., Hegele, R. A., Krauss, R. M., Raal, F. J., Schunkert, H., Watt, G. F., Borén, J., Fazio, S., Horton, J. D., Masana, L., Nicholls, S. J., Nordestgaard, B. G., van de Sluis, B., Taskinen, M. R., ... Catapano, A. L. (2017). Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *European Heart Journal*, 38(32), 2459. <https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHX144>
- Fitzgerald, K., Frank-Kamenetsky, M., Shulga-Morskaya, S., Liebow, A., Bettencourt, B. R., Sutherland, J. E., Hutabarat, R. M., Clausen, V. A., Karsten, V., Cehelsky, J., Nochur, S. v., Koteliński, V., Horton, J., Mant, T., Chiesa, J., Ritter, J., Munisamy, M., Vaishnav, A. K., Gollob, J. A., & Simon, A. (2014). Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *The Lancet*, 383(9911), 60–68. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61914-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61914-5)
- Fitzgerald, K., White, S., Borodovsky, A., Bettencourt, B. R., Strahs, A., Clausen, V., Wijngaard, P., Horton, J. D., Taubel, J., Brooks, A., Vaishnav, A., & Simon, A. (2017). A highly durable RNAi therapeutic inhibitor of PCSK9. *New England Journal of Medicine*, 376(1), 41–51. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609243>

- Fu, X., Inouye, M., & Shinde, U. (2000). Folding Pathway Mediated by an Intramolecular Chaperone: THE INHIBITORY AND CHAPERONE FUNCTIONS OF THE SUBTILISIN PROPEPTIDE ARE NOT OBLIGATORILY LINKED. *Journal of Biological Chemistry*, 275(22), 16871–16878. <https://doi.org/10.1074/JBC.275.22.16871>
- Geselowitz, D. A., & Neckers, L. M. (2009). Bovine Serum Albumin Is a Major Oligonucleotide-Binding Protein Found on the Surface of Cultured Cells. *https://Home.Liebertpub.Com/Ard*, 5(3), 213–217. <https://doi.org/10.1089/ARD.1995.5.213>
- Hardy, J., Niman, S., Pereira, E., Lewis, T., Reid, J., Choksi, R., & Goldfaden, R. F. (2021). A Critical Review of the Efficacy and Safety of Inclisiran. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 21(6), 629–642. <https://doi.org/10.1007/s40256-021-00477-7>
- Honkakoski, P., & Urtili, A. (2021). Biofarmasian tulevaisuuden näkymiä. In *Biofarmasian perusteet 2.painos*, sivut. 218–224. Farmasian opiskelijayhdistys Fortis ry.
- Hu, B., Zhong, L., Weng, Y., Peng, L., Huang, Y., Zhao, Y., & Liang, X. J. (2020). Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/S41392-020-0207-X>
- Kela, Inkliiraani 1.10.2021 alkaen - Lääkekorvaustiedotteet (2021). Viitattu 31.12.2021, Saatavilla: https://www.kela.fi/laakkeet-ja-laakekorvaukset_laakekorvaustiedotteet/-/asset_publisher/rUldRaiKF7xv/content/inkliiraani-1-10-2021-alkaen
- Jeong, H. J., Lee, H.-S., Kim, K.-S., Kim, Y.-K., Yoon, D., & Park, S. W. (2008). Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2. *Journal of Lipid Research*, 49(2), 399–409. <https://doi.org/https://doi.org/10.1194/jlr.M700443-JLR200>
- Kaczmarek, J. C., Kowalski, P. S., & Anderson, D. G. (2017). Advances in the delivery of RNA therapeutics: from concept to clinical reality. *Genome Medicine* 2017 9:1, 9(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S13073-017-0450-0>
- Kahri J, . (2016). Uudet LDL-kolesterolitaisuutta pienentävät lääkkeet. *Duodecim* 132(2):109-11
- Kasichayanula, S., Grover, A., Emery, M. G., Gibbs, M. A., Somaratne, R., Wasserman, S. M., & Gibbs, J. P. (2018). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Evolocumab, a PCSK9 Inhibitor. *Clinical Pharmacokinetics*, 57(7), 769–779. <https://doi.org/10.1007/S40262-017-0620-7/TABLES/2>
- Kastelein, J. J. P., Ginsberg, H. N., Langslet, G., Kees Hovingh, G., Ceska, R., Dufour, R., Blom, D., Civeira, F., Krempf, M., Lorenzato, C., Zhao, J., Pordy, R., Baccara-Dinet, M. T., Gipe, D. A., Geiger, M. J., & Farnier, M. (2015). ODYSSEY FH I and FH II: 78 week results with alirocumab treatment in 735 patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *European Heart Journal*, 36(43), 2996–3003. <https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHV370>
- Koponen, P., Borodulin, K., Lundqvist, A., Sääksjärvi, K., & Koskinen, S. (2018). Terveys, toimintakyky ja hyvinvointi Suomessa: FinTerveys 2017 -tutkimus. *THL-Raportti* 4/2018, 1–219. <https://www.julkari.fi/handle/10024/136223>

- Kotowski, I. K., Pertsemlidis, A., Luke, A., Cooper, R. S., Vega, G. L., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (2006). A Spectrum of PCSK9 Alleles Contributes to Plasma Levels of Low-Density Lipoprotein Cholesterol. *The American Journal of Human Genetics*, 78(3), 410–422. <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/500615>
- Lam, S. S. Y., Chiang, V., Lam, K., Yeung, H. H. Y., Au, E. Y. L., & Li, P. H. (2021). First Confirmed Case of IgE-Mediated Hypersensitivity to Evolocumab with Cross-Reactivity to Alirocumab. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice*, 9(9), 3481-3482.e1. <https://doi.org/10.1016/J.JAIP.2021.06.012>
- Lamb, Y. N. (2021). Inclisiran: First Approval. *Drugs* 2021 81:3, 81(3), 389–395. <https://doi.org/10.1007/S40265-021-01473-6>
- Layzer, J. M., McCaffrey, A. P., Tanner, A. K., Huang, Z., Kay, M. A., & Sullenger, B. A. (2004). In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA*, 10(5), 766. <https://doi.org/10.1261/RNA.5239604>
- Lunven, C., Paehler, T., Poitiers, F., Brunet, A., Rey, J., Hanotin, C., & Sasiela, W. J. (2014). A randomized study of the relative pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of alirocumab, a fully human monoclonal antibody to PCSK9, after single subcutaneous administration at three different injection sites in healthy subjects. *Cardiovascular Therapeutics*, 32(6), 297–301. <https://doi.org/10.1111/1755-5922.12093>
- Lääketieteen sanasto. (2021). Viitattu 9.11.2021. Saatavilla: [https://www.terveysportti.fi/apps/sanakirjat/](https://www terveystoiminta.fi/apps/sanakirjat/)
- Mathews, C. K., van Holde, K. E., Appling, D. R., & Anthony-Cahill, S. J. (2013). *Biochemistry* 4. Painos. Pearson Education Inc.
- Monia, B. P., Johnston, J. F., Sasmor, H., & Cummins, L. L. (1996). Nuclease Resistance and Antisense Activity of Modified Oligonucleotides Targeted to Ha-ras*. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.24.14533>
- Nair, J. K., Willoughby, J. L. S., Chan, A., Charisse, K., Alam, Md. R., Wang, Q., Hoekstra, M., Kandasamy, P., Kel'in, A. v, Milstein, S., Taneja, N., O'Shea, J., Shaikh, S., Zhang, L., van der Sluis, R. J., Jung, M. E., Akinc, A., Hutabarat, R., Kuchimanchi, S., ... Manoharan, M. (2014). Multivalent N-Acetylgalactosamine-Conjugated siRNA Localizes in Hepatocytes and Elicits Robust RNAi-Mediated Gene Silencing. *Journal of the American Chemical Society*, 136(49), 16958–16961. <https://doi.org/10.1021/ja505986a>
- Nassoury, N., Blasiolo, D. A., Tebon Oler, A., Benjannet, S., Hamelin, J., Poupon, V., McPherson, P. S., Attie, A. D., Prat, A., & Seidah, N. G. (2007). The Cellular Trafficking of the Secretory Proprotein Convertase PCSK9 and Its Dependence on the LDLR. *Traffic*, 8(6), 718–732. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0854.2007.00562.X>
- Navarese, E. P., Kołodziejczak, M., Schulze, V., Gurbel, P. A., Tantry, U., Lin, Y., Brockmeyer, M., Kandzari, D. E., Kubica, J. M., D'Agostino, R. B., Kubica, J., Volpe, M., Agewall, S., Kereiakes, D. J., & Kelm, M. (2015). Effects of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Antibodies in Adults With Hypercholesterolemia. *Ann Intern Med*.163(1), 40–51. <https://doi.org/10.7326/M14-2957>

- Page, M. M., & Watts, G. F. (2016). PCSK9 inhibitors – mechanisms of action. *Australian Prescriber*, 39(5), 164. <https://doi.org/10.18773/AUSTPRESCR.2016.060>
- Piper, D. E., Jackson, S., Liu, Q., Romanow, W. G., Shetterly, S., Thibault, S. T., Shan, B., & Walker, N. P. C. (2007). The Crystal Structure of PCSK9: A Regulator of Plasma LDL-Cholesterol. *Structure*, 15(5), 545–552. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2007.04.004/ATTACHMENT/29463EC7-1F9E-4679-B1AB-E00D3158EBBC/MMC1.PDF>
- Poirier, S., Mayer, G., Poupon, V., McPherson, P. S., Desjardins, R., Ly, K., Asselin, M. C., Dy, R., Duclos, F. J., Witmer, M., Parker, R., Prat, A., & Seidah, N. G. (2009). Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced low density Lipoprotein receptor degradation. Evidence for an intracellular route. *Journal of Biological Chemistry*, 284(42), 28856–28864. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.037085/ATTACHMENT/8B5A6E02-B58B-4ABA-98FC-072182C99A6B/MMC1.PDF>
- Rahman, A., & Chaudhary, M. I. (2019). *Frontiers in Cardiovascular Drug Discovery Volume 4*. In *Frontiers in Cardiovascular Drug Discovery 1. painos*, Vol. 4, sivut 148–180. Bentham Science Publishers Ltd.
- Rahman, S. M. A., Baba, T., Kodama, T., Islam, M. A., & Obika, S. (2012). Hybridizing ability and nuclease resistance profile of backbone modified cationic phosphorothioate oligonucleotides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(13), 4098–4102. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2012.05.009>
- Rashid, S., Curtis, D. E., Garuti, R., Anderson, N. N., Bashmakov, Y., Ho, Y. K., Hammer, R. E., Moon, Y.-A., & Horton, J. D. (2005). Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking *Pcsk9*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(15), 5374. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501652102>
- Ray, K. K., Landmesser, U., Leiter, L. A., Kallend, D., Dufour, R., Karakas, M., Hall, T., Troquay, R. P. T., Turner, T., Visseren, F. L. J., Wijngaard, P., Wright, R. S., & Kastelein, J. J. P. (2017). Inclisiran in Patients at High Cardiovascular Risk with Elevated LDL Cholesterol. *New England Journal of Medicine*, 376(15), 1430–1440. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1615758>
- Rimbach, K., Kaiser, S., Helm, M., Dalpke, A. H., & Eigenbrod, T. (2015). 2'-O-Methylation within Bacterial RNA Acts as Suppressor of TLR7/TLR8 Activation in Human Innate Immune Cells. *Journal of Innate Immunity*, 7(5), 482. <https://doi.org/10.1159/000375460>
- Robbins, M., Judge, A., Liang, L., McClintock, K., Yaworski, E., & MacLachlan, I. (2007). 2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists. *Molecular Therapy*, 15(9), 1663–1669. <https://doi.org/10.1038/SJ.MT.6300240/ATTACHMENT/58794B05-37A2-436D-AEB0-238F59A853A0/MMC3.DOC>
- Rosenson, R. S., Hegele, R. A., Fazio, S., & Cannon, C. P. (2018). The Evolving Future of PCSK9 Inhibitors. *Journal of the American College of Cardiology*, 72(3), 314–329. <https://doi.org/10.1016/J.JACC.2018.04.054>

- Russell, D. W., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1989). *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Different Combinations of Cysteine-rich Repeats Mediate Binding of Low Density Lipoprotein Receptor to Two Different Proteins*. 264(36), 21682–21688. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)88240-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)88240-4)
- Sabatine, M. S., Giugliano, R. P., Keech, A. C., Honarpour, N., Wiviott, S. D., Murphy, S. A., Kuder, J. F., Wang, H., Liu, T., Wasserman, S. M., Sever, P. S., & Pedersen, T. R. (2017). Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine*, 376(18), 1713–1722. https://doi.org/10.1056/NEJMOA1615664/SUPPL_FILE/NEJMOA1615664_DISCLOSURES.PDF
- Santos, R. D., Stein, E. A., Hovingh, G. K., Blom, D. J., Soran, H., Watts, G. F., López, J. A. G., Bray, S., Kurtz, C. E., Hamer, A. W., & Raal, F. J. (2020). Long-Term Evolocumab in Patients With Familial Hypercholesterolemia. *Journal of the American College of Cardiology*, 75(6), 565–574. <https://doi.org/10.1016/J.JACC.2019.12.020>
- Schneider, W. J. (2016). Lipoprotein Receptors. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes: 6. painos*, 489–518. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63438-2.00017-1>
- Schwartz, G. G., Steg, P. G., Szarek, M., Bhatt, D. L., Bittner, V. A., Diaz, R., Edelberg, J. M., Goodman, S. G., Hanotin, C., Harrington, R. A., Jukema, J. W., Lecorps, G., Mahaffey, K. W., Moryusef, A., Pordy, R., Quintero, K., Roe, M. T., Sasiela, W. J., Tamby, J.-F., ... Zeiher, A. M. (2018). Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 379(22), 2097–2107. https://doi.org/10.1056/NEJMOA1801174/SUPPL_FILE/NEJMOA1801174_DISCLOSURES.PDF
- Seidah, N. G. (2013). Proprotein Convertase PCSK9. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3, 3315–3322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00732-8>
- Seidah, N. G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S. B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A., & Chrétien, M. (2003). The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): Liver regeneration and neuronal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(3), 928. <https://doi.org/10.1073/pnas.0335507100>
- Sioud, M., Furset, G., & Cekaite, L. (2007). Suppression of immunostimulatory siRNA-driven innate immune activation by 2'-modified RNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361(1), 122–126. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2007.06.177>
- Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J., & Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 305(5689), 1434–1437. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1102514/SUPPL_FILE/SONG.SOM.PDF
- Steirer, L. M., Park, E. I., Townsend, R. R., & Baenzinger, J. U. (2009). The Asialoglycoprotein Receptor Regulates Levels of Plasma Glycoproteins Terminating with Sialic Acid α 2,6-Galactose. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(6), 3777. <https://doi.org/10.1074/JBC.M808689200>

- Turpeinen, M., & Hakkola, J. (2019). 3.83 Lääkeainemetaboliaan vaikuttavat ympäristötekijät. Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia 5.painos, sivut 99–106. Otavan Kirjapaino Oy.
- Vanhanen E, Strandberg T (2021). Dyslipidemioiden määritelmä ja diagnostiikka. Lääkäriin käsikirja. Viitattu 9.10.2021. Saatavilla: <https://www.terveysportti.fi/apps/dtk/ltk/article/ykt00594>
- Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispens, T. (2014). IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00520>
- Wise, J. (2021). GP leaders warn over the rollout of cholesterol lowering inclisiran in primary care. *BMJ*, 375, n3025. <https://doi.org/10.1136/bmj.n3025>
- Wolfrum, C., Shi, S., Jayaprakash, K. N., Jayaraman, M., Wang, G., Pandey, R. K., Rajeev, K. G., Nakayama, T., Charrise, K., Ndungo, E. M., Zimmermann, T., Koteliensky, V., Manoharan, M., & Stoffel, M. (2007). Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nature Biotechnology* 2007 25:10, 25(10), 1149–1157. <https://doi.org/10.1038/NBT1339>
- Wright, R. S., Collins, M. G., Stoekenbroek, R. M., Robson, ; Richard, Wijngaard, P. L. J., Landmesser, U., Leiter, L. A., Kastelein, J. J. P., Ray, K. K., & Kallend, D. (2019). Effects of Renal Impairment on the Pharmacokinetics, Efficacy, and Safety of Inclisiran: An Analysis of the ORION-7 and ORION-1 Studies. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.08.021>
- Zhang, D. W., Lagace, T. A., Garuti, R., Zhao, Z., McDonald, M., Horton, J. D., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (2007). Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(25), 18602–18612. <https://doi.org/10.1074/JBC.M702027200/ATTACHMENT/956CC431-76AE-41A2-AD91-356A5F13FC9D/MMC1.PDF>
- Zhang, M. M., Bahal, R., Rasmussen, T. P., Manautou, J. E., & Zhong, X. bo. (2021). The growth of siRNA-based therapeutics: Updated clinical studies. *Biochemical Pharmacology*, 189, 114432. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2021.114432>
- Zhang, X. L., Zhu, Q. Q., Zhu, L., Chen, J. Z., Chen, Q. H., Li, G. N., Xie, J., Kang, L. N., & Xu, B. (2015). Safety and efficacy of anti-PCSK9 antibodies: A meta-analysis of 25 randomized, controlled trials. *BMC Medicine*, 13(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/S12916-015-0358-8/FIGURES/5>