

IWONA MARIA RYBAKOWSKA<sup>1</sup>, JACEK SEIN-ANAND<sup>2</sup>

**INHIBICJA BIAŁEK TRANSPORTUJĄCYCH  
ESTRY CHOLESTEROLU – NIEPOWODZENIA  
ORAZ NADZIEJE LECZENIA CHOROÓB WIĘNCOWYCH SERCA**

*CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN INHIBITION – PAST FAILURES AND  
FUTURE HOPES IN TREATMENT OF CORONARY HEART DISEASES*

<sup>1</sup>Zakład Biochemii i Fizjologii Klinicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
kierownik: dr n. med. Iwona Rybakowska

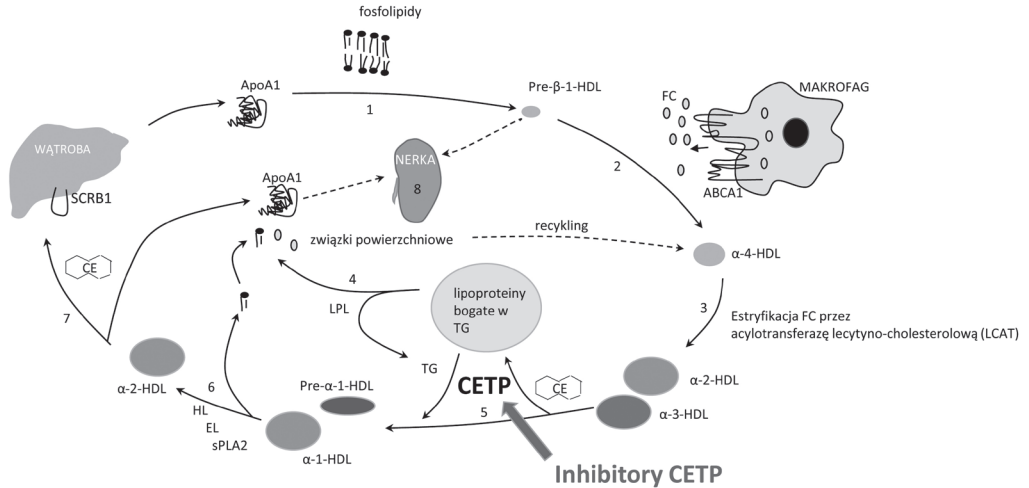
<sup>2</sup>Zakład Toksykologii Klinicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
kierownik: dr hab. med. Jacek Sein-Anand

Przeciwmiażdżycowa rola lipoprotein cholesterolu o wysokiej gęstości (HDL-C) w chorobach sercowo-naczyniowych została wyraźnie potwierdzona, dane epidemiologiczne wskazują na silną odwrotną korelację pomiędzy poziomem HDL-C a ryzykiem zdarzeń sercowo-naczyniowych, który jest niezależny od poziomu cholesterolu lipoprotein niskiej gęstości (LDL-C). Logiczna jest więc hipoteza: wzrost HDL-C może prowadzić do redukcji ryzyka sercowo-naczyniowego. Białka transportujące estry cholesterolu (CETP) promują transfer estrów cholesterolu z HDL do VLDL oraz LDL. W związku z tym inhibicja CETP powoduje wzrost poziomu HDL-C, obniża poziom LDL-C i jest przedmiotem zainteresowania klinicystów.

Rola w patofizjologii miażdżycy cholesterolu zawartego w niskiej gęstości lipoproteinach (LDL-C) została wyraźnie określona, użycie czynników zmniejszających ilość LDL, szczególnie statyn, prowadziło do wyraźnej redukcji zdarzeń sercowo-naczyniowych zarówno w pierwotnej [6], jak i wtórnej prewencji [5]. Jednak znaczące ryzyko sercowo-naczyniowe pozostaje nawet po osiągnięciu optymalnego stężenia LDL i spośród głównie używanych statyn maksymalna redukcja ryzyka nie przekracza 47%. Z drugiej strony, badania epidemiologiczne dowodzą silnej odwrotnej zależności pomiędzy poziomem cholesterolu lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL-C) a ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych, który jest niezależny od poziomu LDL-C, nawet jeśli stężenie LDL-C jest mniejsze niż 70 mg/dl [4]. Epidemiologiczne badania dowodzą, że wzrost HDLC, poprzez mechanizm związany z CETP, może zredukować naczyniowe zdarzenia. W badaniach na 18 245 kobietach stwierdzono polimorfizm pojedynczego nukleotydu związanego z HDLC oraz CETP, powodujący w przyszłości ryzyko zawału mięśnia sercowego, co związane jest najprawdopodobniej z rolą CETP w miażdżycy tętnic [7].

## INHIBITORY CETP

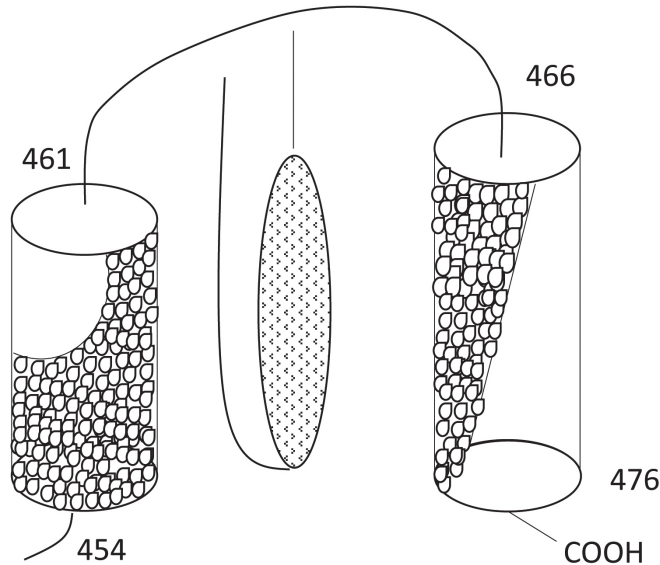
Białka transportujące estry cholesterolu (CETP) są hydrofobowymi glikoproteinami, które są wydzielane głównie przez wątrobę i pochodzą w większości z komórek Kupffera, krążąc w osoczu, wiążąc



Rycina 1. Odwrotny transport cholesterolu (RCT). Apolipoproteina (ApoA1), wydzielana przez wątrobę i jelito, w połączeniu z fosfolipidami, formuje małe dyskooidalne lipoproteiny pre- $\beta$ -1 o wysokiej gęstości (HDL), które mogą wiązać cholesterol (1). Pre- $\beta$ -1 HDL jest następnie przekształcane do dyskooidalnego  $\alpha$ -4 HDL przez wypływ wolnego cholesterolu (FC) z makrofagów przez transportery ABCA1 oraz ABCG1 (2). Cholesterol ten jest estryfikowany przez acylotransferazę lecytyno-cholesterolową (LCAT) (3). Przeniesienie estru cholesterolu (CE) do jądra cząsteczki HDL przekształca  $\alpha$ -4 HDL do większych HDL  $\alpha$ -2 i  $\alpha$ -3 [9]. Lipaza lipoproteiny (LPL) hydrolizuje triglicerydy (TG), prowadząc do powstania lipoprotein bogatych w triglicerydy (TRL), dostarczając związków powierzchniowych (fosfolipidów, wolnego cholesterolu, apolipoprotein) cząsteczce HDL (4). TG z TRL są wymieniane z estrami cholesterolu HDL poprzez białko, przenoszące estry cholesterolu (CETP), powodując formowania pre- $\alpha$  i pre- $\alpha$ -1 HDL (5). Osoczowe enzymy: lipaza (LP), endotelialna lipaza (EL), wydzielnicza fosfolipaza A2 (sPLA2) hydrolizują i przenoszą fosfolipidy z nowo powstałych HDL, przekształcając  $\alpha$ -1 HDL do  $\alpha$ -2 HDL przez krążącą ApoA1 (6). Następnie wątroba wiąże CE z HDL przez receptor SCR1 (7). Końcowym krokiem RCT jest katabolizm wolnej ApoA1 oraz pre- $\beta$ -1 HDL przez nerki w moczu (8) [1]. Na podstawie Gurfinkel R. and Joy T. 2011 [1].

Figure 1. Reverse cholesterol transport (RCT). Apolipoprotein A1 (ApoA1) secreted by the liver and intestine combines with phospholipids to form small, discoidal pre- $\beta$ -1 high density lipoproteins (HDL) binding cholesterol (1). Pre- $\beta$ -1 HDL is converted to small, discoidal  $\alpha$ -4 HDL by the efflux of cellular free cholesterol (FC) from macrophages by the ABCA1 and ABCG1 transporters (2). This cholesterol is then esterified by lecithin-cholesterol acyl transferase (LCAT) (3). The movement of cholesterol ester (CE) to the core of HDL particle converts the  $\alpha$ -4 HDL into larger  $\alpha$ -2 and  $\alpha$ -3 HDL [9]. Lipoprotein lipase (LPL) hydrolyses the triglyceride (TG) carried on TG-rich lipoproteins (TRL) to provide surface components (phospholipids, FC, and apolipoproteins) to the HDL particle (4). TG from TRL is exchanged for CE on HDL through cholesteryl ester transfer protein (CETP) resulting in the formation of pre- $\alpha$  and pre- $\alpha$ -1 HDL (5). The plasma enzymes: hepatic lipase (HL), endothelial lipase (EL) and secretory phospholipase A2 (sPLA2) hydrolyse and remove phospholipids from the newly formed HDL, converting  $\alpha$ -1 HDL into  $\alpha$ -2 HDL with recycling of Surface ApoA1 protein (6). The liver then takes up CE from HDL by scavenger receptor B1 (SCR1) (7) and recycling of the surface components of HDL. The final step of RCT is the catabolism of free ApoA1 and pre- $\beta$ -1 HDL by the kidney with excretion in the urine (8). Modified, based on Gurfinkel R. and Joy T. 2011 [1].

żą się głównie z HDL. U osób z zasadniczo normalnym poziomem lipidów stężenie CETP wynosi 1-4  $\mu\text{g/ml}$ , podczas gdy stężenie może być od 70 do 80% większe u osób z hiperlipidemią. Rolą CETP jest transport estrów cholesterolu z HDL do VLDL oraz LDL. Stąd inhibicja CETP (Ryc. 1) powoduje wzrost poziomu cholesterolu związanego z HDL (HDL-C) oraz obniżenie poziomu cholesterolu LDL (LDL-C) [4]. Ponadto u pacjentów z mutacją genu CETP stwierdzono podwyższony poziom HDL i obniżoną ilość incydentów chorób sercowo-naczyniowych [2, 3]. Spekulatywny model tworzenia neutralnego miejsca wiązania lipidów przez C-terminalny region CETP przedstawiony jest na rycinie 2.



Rycina 2. Spekulatywny model tworzenia neutralnego miejsca wiązania lipidów przez C-terminalny region CETP. Amfipatyczna C-terminalna helisa (aminokwasy 466-476) pokazana jest ze swoją hydrofobową częścią w bezpośrednim kontakcie z cząsteczką estru cholesterolu. Pętla pomiędzy aminokwasami 461 a 466 pozwala hydrofobowym aminokwasom (465-461) tworzyć inną „twarz” hydrofobowej powierzchni, w kontakcie z estrem cholesterolu. Drugorzędowa struktura tego regionu może zawierać  $\alpha$ -helisy lub  $\beta$ -harmonijki. Bardzo prawdopodobne, że inne części cząsteczki CETP mogą być związane z tworzeniem hydrofobowej powierzchni, w kontakcie z neutralnymi lipidami. Sugeruje się, że C-terminalna helisa formuje mobilny fragment, który umożliwia bezpośredni kontakt z neutralnym lipidem podczas procesu transferu. Na podstawie Tall A.R. 1993 [10].

*Figure 2. A speculative model for how the C-terminal region of CETP might form a neutral lipid site. The amphipathic C-terminal helix (amino acids 466 to 476) of CETP is shown with its hydrophobic face in direct contact with cholesterol ester molecule. A turn between amino acids 461 to 466 allows the hydrophobic amino acids (454 to 461) to form another face of the hydrophobic surface in contact with cholesterol ester. The secondary structure of this region could involve an  $\alpha$ -helix, as shown, or  $\beta$ -strand. It is highly likely that other parts of the CETP molecule would be involved in forming the hydrophobic surface in contact with neutral lipid. It is suggested that the C-terminal helix forms a mobile segment which makes direct contact with neutral lipid during the lipid transfer process. Reproduced from Tall A.R. 1993 [10].*

### TORCETRAPIB

Pierwszy z badanych inhibitorów CETP – torcetrapib – wykazał w badaniach na zwierzętach właściwości hamujące rozwój miażdżycy. Ponadto w badaniach przeprowadzonych na ludziach torcetrapib powodował, zależny od dawki, wzrost HDL-C do 106% i redukcję LDL-C do 42%. W związku z tym badano hipotezę obniżenia zdarzeń chorób sercowo-naczyniowych w populacji wysokiego ryzyka po podaniu torcetrapibu 15 067 pacjentom. W badaniach tych pacjenci losowo otrzymywali atorwastatynę oraz 60 mg torcetrapibu dziennie lub atorwastatynę i placebo. Pomimo iż u pacjentów, którzy otrzymywali torcetrapib, zaobserwowano 72,1% wzrost HDL-C oraz 24,9% obniżenie LDL-C, badania zostały przedwcześnie zakończone z powodu 25% wzrostu zdarzeń sercowo-naczyniowych oraz 58% wzrostu śmiertelności w grupie, której podawano torcetrapib. Podawanie torcetrapibu było związane ze wzrostem ciśnienia skurczowego o 5,5 mm Hg, obniżeniem stężenia potasu a wzrostem sodu i dwuwęglanu, któremu przypisywano właściwości czynnika wywołującego hiperaldosteronizm, odpowiedzialny częściowo za wzrost śmiertelności. W innych niezależnych badaniach nie stwierdzono różnic w ilości powstającej blaszki miażdżycowej, stosując kombinację atorwastatyny oraz torcetrapibu względem samej atorwastatyny. W związku z tym badań nad torcetrapibem ostatecznie zaniechano [4].

### DALCETRAPIB

W drugiej fazie badań dalcetrapibu stwierdzono redukcję aktywności CETP oraz powstawania zależnego od dawki wzrostu HDL-C do 36% bez żadnych znaczących zmian poziomu LDL-C. Ponadto nie były zmienione: ciśnienie krwi, produkcja aldosteronu, poziom mRNA cytochromu P45011B2, funkcja endotelium zależna od NO, czynniki zapalenia oraz stres oksydacyjny [4]. W badaniach na grupie 15 871 pacjentów z ostrym syndromem wieńcowym podawano 600 mg dalcetrapibu względem placebo oraz dostępnych, podstawowych stosowanych leków, w tym statyn. Punktem końcowym w ocenie skuteczności była śmierć z powodu chorób sercowo-naczyniowych, niewywołujący zgonu zawał, udar niedokrwienny, niestabilna dusznica, zatrzymanie pracy serca z resuscytacją. Poziom HDL-C wzrósł ze stanu podstawowego do 31-40% w grupie dalcetrapibu, podczas gdy u placebo wzrastał do 4-11%. Dalcetrapib wywierał minimalny efekt na poziom LDL-C, obserwowano również 9% wzrost poziomu apolipoproteiny A (Apo-A1), podczas gdy efekt na apolipoproteinę B (Apo-B) był jedynie minimalny. Dalcetrapib może powodować wzrost poziomu białka C-reaktywnego (CRP) o 18% w stosunku do grupy otrzymującej placebo.

Jednak badania zatrzymano po drugiej analizie przejściowej, ponieważ dalcetrapib nie zmienił ryzyka powstawania chorób sercowo-naczyniowych oraz śmiertelności względem placebo [8]. Biorąc pod uwagę przedstawione wyniki, zaniechano badań nad dalcetrapibem. Ostatnie badania wskazały, że efekt dalcetrapibu na zmiany miażdżycowe był związany z polimorfizmem genu ADCY9, w przybliżeniu jeden pacjent na pięciu posiada właściwy profil genetyczny, wykazując w ten sposób protekcyjny efekt względem zdarzeń sercowo-naczyniowych [11], co może prowadzić do spersonalizowanej terapii dalcetrapibem.

### POTENCJALNE PRZYCZYNY BRAKU REDUKCJI RYZYKA SERCOWO-NACZYNIOWEGO W WYNIKU INHIBICJI CETP

Istnieje kilka hipotez usiłujących wyjaśnić niepowodzenie badanych inhibitorów CETP na redukcję ryzyka sercowo-naczyniowego. Rola inhibitorów CETP w odwrotnym transporcie cholesterolu

(RCT) makrofag-kał pozostaje niejasna. RCT makrofag-kał jest krytycznym aterogennym procesem i obejmuje wpływ nadmiaru komórkowego cholesterolu z tętnicznych makrofagów do zewnątrzkomórkowych HDL, działających jako akceptory, transportery, takie jak: transporter A1 wiążący kasetę ATP (ABCA1) oraz transporter G1 wiążący kasetę ATP. Po wypływie do HDL cholesterol może być zestyfikowany w plazmie przez acylotransferazę lecytyno-cholesterolową i docelowo jest transportowany z HDL do wątroby albo bezpośrednio przez receptor BI, albo po transferze do lipoprotein zawierających Apo-B przez CETP. Z wątroby cholesterol jest wydalany do żółci i docelowo do kału. Dostępne badania na zwierzętach, biorąc pod uwagę konsekwencje aktywności CETP dla miażdżycowo protekcyjnej ścieżki RCT, dostarczają niejednoznacznych danych faworyzowanego wzrostu, jak i inhibicji aktywności CETP. Dodatkowo badania na chomikach z dyslipidemią wykazały, że inhibicja CETP nie stymuluje RCT. Ta obserwacja daje wzrost prawdopodobieństwa, że inhibicja CETP nie może niezależnie dramatycznie zmniejszać zmian miażdżycowych, ale w kombinacji z innymi lekami modyfikującymi lipidy (np. berberyną obniżającą poziom LDL) może mieć znaczący wpływ. Natomiast inne badania wykazały wzrost o 10 lat śmiertelności pacjentów z chorobami wieńcowymi (CAD), którym podawano statyny, a posiadającym jednocześnie genetyczny wariant, polegający na obniżeniu poziomu CETP [4].

Ponadto to raczej cząstka HDL, a nie stężenie HDL-C, jest ważna dla przewidywania ryzyka sercowo-naczyniowego. Istnieją dowody, iż małej gęstości HDL wykazują właściwości antyoksydacyjne, przeciwzapalne, cytoprotekcyjne, przeciwinfekcyjne i najprawdopodobniej promują bardziej wpływ cholesterolu z makrofagów zawierających lipidy w porównaniu do większych cząsteczek HDL.

### PRZYSZŁOŚĆ INHIBICJI CETP

Mając nadzieję, że inhibitory CETP mogą zredukować ryzyko powstawania chorób sercowo-naczyniowych, badane są kolejne nowe inhibitory CETP. Jednym z nich jest anacetrapib, podawany w dawce 100 mg na dzień przez 76 tygodni, względem placebo, dodawany do stosowanej terapii lipidowej osobom z chorobami sercowo-naczyniowymi. W grupie, której podawano anacetrapib, zaobserwowano 138% wzrost poziomu HDL-C oraz 39,8% redukcję LDL-C. Ponadto anacetrapib powodował wzrost poziomu Apo-A1 o 44,7% oraz obniżenie poziomu Apo-B o 21%. Nie zaobserwowano zmian istotnych statystycznie w grupie anacetrapib oraz placebo ciśnienia skurczowego oraz rozkurczowego. Nie zaobserwowano również zmian poziomu potasu, chlorków, wodorowęglanów lub aldosteronu. W modelu zwierzęcym anacetrapib redukował, zależnie od dawki, miażdżycę i utrzymywał stabilność uzyskanych zmian. Obecnie anacetrapib jest w III fazie badań, które zakończą się w 2017 roku. Odpowiedzieć mają one na pytanie: czy anacetrapib może zredukować ryzyko śmierci wieńcowej, zawału mięśnia sercowego, wieńcowej rewaskularyzacji.

Krytyczna rola HDL w protekcji zmian miażdżycowych została dobrze poznana. Inhibitory CETP stanowią nową klasę związków, zwiększających znacząco HDL-C, wykazując również efekt zmniejszający LDL-C. Chociaż początkowe badania z inhibitorami CETP – torcetrapibem oraz niewykazującym negatywnych efektów dalcetrapibem – nie redukowały zdarzeń sercowo-naczyniowych, obecnie w fazie badań klinicznych znajduje się kolejny: anacetrapib. Wyniki tych badań dadzą ostateczną odpowiedź na pytanie, czy inhibicja CETP może aktualnie efektywniej niż do tej pory zredukować ryzyko sercowo-naczyniowe, szczególnie że użycie statyn prowadziło, co prawda, do znaczącej redukcji zdarzeń sercowo-naczyniowych, jednak maksymalna redukcja ryzyka nie przekraczała 47%.

## PIŚMIENNICTWO

1. Gurfinkel R., Joy T. R.: Anacetrapib: hope for CETP inhibitors? *Cardiovasc. Ther.* 2011, 29, 5, 327. – 2. Inazu A., Brown M. L., Hesler C. B., Agellon L. B., Koizumi J., Takata K., Maruhama Y., Mabuchi H., Tall A. R.: Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N. Engl. J. Med.* 1990, 323, 18, 1234. – 3. Koizumi J., Mabuchi H., Yoshimura A., Michishita I., Takeda M., Itoh H., Sakai Y., Ueda K., Takeda R.: Deficiency of serum cholesteryl-ester transfer activity in patients with familial hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 1985, 58, 1-3, 175. – 4. Kosmas C. E., DeJesus E., Rosario D., Vittorio T. J.: CETP inhibition: past failures and future hopes. *Clin. Med. Insights Cardiol.* 2016, 10, 37. – 5. LaRosa J. C., Grundy S. M., Waters D. D., Shear C., Barter P., Fruchart J. C., Gotto A. M., Greten H., Kastelein J. J., Shepherd J., Wenger N. K., Treating to New Targets (TNT) Investigators: Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease. *N. Engl. J. Med.* 2005, 352, 14, 1425. – 6. O'Keefe J. H., Cordain L., Harris W. H., Moe R. M., Vogel R.: Optimal low-density lipoprotein is 50 to 70 mg/dl: lower is better and physiologically normal. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004, 43, 11, 2142. – 7. Ridker P. M., Paré G., Parker A. N., Zee R. Y. L., Miletich J. P., Chasman D. I.: Polymorphism in the CETP gene region, HDL cholesterol, and risk of future myocardial infarction: genomewide analysis among 18 245 initially healthy women from Women's Genome Health Study. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2009, 2, 1, 26. – 8. Schwartz G. G., Olsson A. G., Abt M., Ballantyne C. M., Barter P. J., Brumm J., Chaitman B. R., Holme I. M., Kallend D., Leiter L. A., Leitersdorf E., McMurray J. J., Mundl H., Nicholls S. J., Shah P. K., Tardif J. C., Wright R. S., dal-OUTCOMES Investigators: Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2012, 367, 22, 2089. – 9. Senderowska Z., Sein Anand J., Rybakowska I.: Paraoksonaza I wpływająca na lipoproteiny o wysokiej gęstości czynnikiem ochronnym przed miażdżycą tętnic. *Ann. Acad. Med. Gedan.* 2015, 45, 71.
10. Tall A. R.: Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J. Lipid. Res.* 1993, 34, 8, 1255. – 11. Tardif J. C., Rhéaume E., Lemieux Perreault L. P., Grégoire J. C., Feroz Zada Y., Asselin G., Provost S., Barhdadi A., Rhainds D., L'Allier P. L., Ibrahim R., Upmanyu R., Niesor E. J., Benghozi R., Suchankova G., Laghrissi-Thode F., Guertin M. C., Olsson A. G., Mongrain I., Schwartz G. G., Dubé M. P.: Pharmacogenomic determinants of the cardiovascular effects of dalcetrapib. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2015, 8, 2, 372.

I. Rybakowska, J. Sein-Anand

*CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN INHIBITION - PAST FAILURES AND FUTURE HOPES IN TREATMENT OF CORONARY HEART DISEASES*

SUMMARY

*The atheroprotective role of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in cardiovascular disease has been unequivocally established, and epidemiological data have clearly demonstrated a strong inverse relationship between HDL-C levels and the risk of cardiovascular events, which is independent of the low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels. Thus, it would be logical to hypothesize that raising HDL-C might potentially lead to reduction of cardiovascular risk. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) promotes the transfer of cholesteryl esters from HDL to very low-density lipoprotein and LDL. Therefore, CETP inhibition raises HDL-C levels, decreases LDL-C levels and is subject of research for clinical scientist.*

Adres: dr Iwona Rybakowska  
Zakład Biochemii i Fizjologii Klinicznej GUMed  
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk  
e-mail: iwonar@gumed.edu.pl