

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391723** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2024.02.09

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)  
*A61K 47/54* (2017.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.12.10

---

(54) **ПЕРОРАЛЬНАЯ ДОСТАВКА АНТИСМЫСЛОВЫХ КОНЬЮГАТОВ, НАЦЕЛЕННЫХ  
НА PCSK9**

---

(31) 63/124,581; 63/134,884; 63/178,340;  
63/261,505

(71) Заявитель:  
**СИВИ БИОФАРМА, ИНК. (US)**

(32) 2020.12.11; 2021.01.07; 2021.04.22;  
2021.09.22

(72) Изобретатель:  
**Эрум Хенрик, Нобле Стюарт Элвин,  
Шеар Чарльз Лестер (US)**

(33) US

(86) PCT/US2021/062831

(87) WO 2022/125913 2022.06.16

(74) Представитель:  
**Суюндуков М.Ж. (KZ)**

---

(57) Изобретение относится к фармацевтическим композициям для пероральной доставки, содержащим антисмысловой олигонуклеотид (например, CIVI 008) и средство для пероральной доставки, такое как 5-CNAC. В некоторых аспектах в изобретении предложена капсула, содержащая сухую смесь CIVI 008 и 5-CNAC и необязательно статин.

**A1**

**202391723**

**202391723**

**A1**

## ПЕРОРАЛЬНАЯ ДОСТАВКА АНТИСМЫСЛОВЫХ КОНЬЮГАТОВ, НАЦЕЛЕННЫХ НА PCSK9

### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ И ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[1] Настоящая заявка РСТ испрашивает приоритет предварительных заявок США №№ 63/124,581, поданной 11 декабря 2020 г., 63/134,884, поданной 7 января 2021 г., 63/178,340, поданной 22 апреля 2021 г., и 63/261,505, поданной 22 сентября 2021 г., которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

### ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[2] Содержимое представленного в электронном виде списка последовательностей в текстовом файле ASCII (название 4009-021PC04\_Sequence\_listing\_ST25.txt; размер: 26230 байтов и дата создания: 9 декабря 2021 г.), поданного вместе с заявкой, полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[3] Настоящее изобретение относится к пероральным композициям конъюгатов антисмысловых олигонуклеотидов, которые нацелены на мРНК пропротеинконвертазы субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9) в клетке, что приводит к снижению экспрессии PCSK9. Снижение экспрессии PCSK9 полезно при ряде медицинских расстройств, таких как гиперхолестеринемия и родственные расстройства.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[4] PCSK9 стала терапевтической мишенью для снижения холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП-Х). PCSK9 увеличивает деградацию рецептора ЛПНП, что приводит к высокому уровню холестерина ЛПНП у лиц с высокой активностью PCSK9. Lindholm et al., *Molecular Therapy* (2012); 20 2, 376-381 сообщают об антисмысловом олигонуклеотиде LNA, нацеленном на PCSK9, который вызывает устойчивое снижение ЛПНП-Х у приматов, отличных от человека. Используемое соединение представляло

собой 14-мер, названный SPC5001, который также был описан в опубликованной международной заявке WO 2011/009697. Это соединение было забраковано во время клинических испытаний из-за тяжелой почечной токсичности и острого повреждения почек. См., например, van Poelgeest et al. (2013) American Journal of Kidney Disease 62(4):796-800.

**[5]** Пероральная доставка фармакологически активных агентов, как правило, является предпочтительным путем доставки, поскольку она удобна, относительно проста и, как правило, безболезненна, что приводит к большей приверженности пациента по сравнению с другими способами доставки. Однако биологические, химические и физические барьеры, такие как переменный pH в желудочно-кишечном тракте, сильнодействующие пищеварительные ферменты и непроницаемые для активных агентов желудочно-кишечные мембраны, делают пероральную доставку некоторых фармакологически активных агентов млекопитающим проблематичной, например, пероральную доставку терапевтических нуклеиновых кислот, таких как антисмысловые олигонуклеотиды. Соответственно, существует потребность в разработке систем, позволяющих осуществлять пероральную доставку терапевтических нуклеиновых кислот, таких как антисмысловые олигонуклеотиды.

## КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

**[6]** Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигомер (например, антисмысловой олигонуклеотид, АСО), и средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10, 5-CNAC или его соль, гидрат или сольват, или их комбинацию), при этом антисмысловой олигомер имеет длину от 16 до 22 последовательных нуклеотидов, при этом последовательность антисмыслового олигомера содержит непрерывную последовательность длиной 16 нуклеотидов, которая на 100% комплементарна последовательности SEQ ID NO: 31, при этом антисмысловой олигомер представляет собой гэтмер, содержащий по меньшей мере одно звено LNA, и при этом антисмысловой олигомер нацелен на РНК, кодирующую PCSK9. В некоторых аспектах, РНК представляет собой пре-мРНК, сплайс-вариант пре-мРНК, зрелую мРНК или ее аллельный вариант или мутант. В некоторых аспектах, антисмысловой олигомер нацелен на последовательность внутри экзона. В некоторых аспектах, антисмысловой олигомер нацелен на последовательность внутри интрона. В некоторых аспектах, антисмысловой олигомер нацелен на последовательность, содержащую соединение между экзоном и

интроном. В некоторых аспектах, антисмысловой олигомер нацелен на последовательность выше 5' конца открытой рамки считывания, кодирующей PCSK9 (например, 5' UTR). В некоторых аспектах, антисмысловой олигомер нацелен на последовательность ниже 3' конца открытой рамки считывания, кодирующей PCSK9 (например, 3' UTR).

[7] В некоторых аспектах, LNA представляет собой окси-LNA, тио-LNA, амино-5 LNA, 5'-метил-LNA, ENA, сЕТ, сМОЕ или их комбинацию. В некоторых аспектах, LNA представляет собой стереоизомер в конфигурации  $\beta$ -D- или конфигурации  $\alpha$ -L. В некоторых аспектах, антисмысловой олигомер содержит по меньшей мере одно звено сЕТ. В некоторых аспектах, антисмысловой олигомер содержит 2, 3, 4, 5, 6 или 7 звеньев LNA. В некоторых аспектах, каждое звено LNA в антисмысловом олигомере представляет собой стереоизомер в одной и той же конфигурации. В некоторых аспектах, каждое звено LNA в антисмысловом олигомере представляет собой звено  $\beta$ -D-окси LNA. В некоторых аспектах, каждое звено LNA в антисмысловом олигомере представляет собой звено  $\alpha$ -L-окси-LNA.

[8] В некоторых аспектах, последовательность антисмыслового олигомера содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную, фосфородитиоатную, метилфосфонатную, фосфорамидатную или боранофосфатную межнуклеозидную связь. В некоторых аспектах, все межнуклеозидные связи являются тиофосфатными. В некоторых аспектах, одна или несколько межнуклеозидных связей содержат хиральный центр в R-конформации и/или в S-конформации. В некоторых аспектах, все хиральные центры находятся в R-конформации. В некоторых аспектах, все хиральные центры находятся в S-конформации. В некоторых аспектах, антисмысловой олигомер и олигомер SEQ ID NO: 31 могут образовывать дуплекс с повышенной термостабильностью по сравнению с соответствующим дуплексом, содержащим соответствующий антисмысловой олигомер без LNA.

[9] Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей конъюгат антисмыслового олигонуклеотида и средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10, 5-CNAC или их соль, гидрат или сольват, или их комбинацию), при этом конъюгат антисмыслового олигонуклеотида содержит

(i) антисмысловой олигомер, состоящий из 16-22 последовательных нуклеотидов, при этом последовательность антисмыслового олигомера содержит непрерывную последовательность длиной 16 нуклеотидов, которая на 100% комплементарна

последовательности SEQ ID NO: 31, и при этом антисмысловой олигомер представляет собой гэпмер, содержащий по меньшей мере одно звено LNA, и

(ii) по меньшей мере один нуклеотидный или непонуклеотидный фрагмент, ковалентно присоединенный к указанному антисмысловому олигомеру непосредственно или через линкер, расположенный между непрерывной последовательностью олигомера и нуклеотидным или непонуклеотидным фрагментом,

при этом конъюгат антисмыслового олигонуклеотида нацелен на РНК, кодирующую PCSK9, например, мРНК.

**[10]** В некоторых аспектах, РНК представляет собой пре-мРНК, сплайс-вариант пре-мРНК, зрелую мРНК или ее аллельный вариант или мутант, как описано выше.

**[11]** В некоторых аспектах, нуклеотидный или непонуклеотидный фрагмент представляет собой фрагмент, нацеленный на печень, который присоединен к 5'-концу или к 3'-концу антисмыслового олигомера. В некоторых аспектах, фрагмент, нацеленный на печень, связан с антисмысловым олигомером через линкер. В некоторых аспектах, фрагмент, нацеленный на печень, содержит фрагмент углеводного конъюгата, содержащий углевод, выбранный из группы, состоящей из галактозы, лактозы, N-ацетилгалактозамина (GalNAc), маннозы, маннозо-6-фосфата и их комбинаций.

**[12]** В некоторых аспектах, углеводный конъюгат не представляет собой линейный углеводный полимер. В некоторых аспектах, углеводный конъюгат представляет собой углеводную группу, содержащую 1, 2, 3 или 4 углеводных фрагмента. В некоторых аспектах, все углеводные фрагменты идентичны. В некоторых аспектах, по меньшей мере одна углеводная составляющая отличается (не идентична) по отношению к другим углеводным составляющим. В некоторых аспектах, фрагмент углеводного конъюгата содержит по меньшей мере один фрагмент конъюгата, нацеленный на рецептор асиалогликопротеина. В некоторых аспектах, фрагмент конъюгата, нацеленный на асиалогликопротеиновый рецептор, содержит одновалентный, двухвалентный, трехвалентный или четырехвалентный кластер GalNAc. В некоторых аспектах, каждый GalNAc в кластере GalNAc присоединен к группе точек ветвления через спейсер. В некоторых аспектах, группа точек ветвления содержит пептид, например, дилизин. В некоторых аспектах, спейсер содержит ПЭГ спейсер. В некоторых аспектах, линкер содержит C6 - C12 аминоалкильную группу или биорасщепляемый фосфатный нуклеотидный линкер, содержащий от 1 до 6 нуклеотидов. В некоторых аспектах, трехвалентный кластер GalNAc содержит фрагмент конъюгата Conj 1, Conj 2, Conj 1a или Conj 2a GalNAc. В некоторых аспектах, нуклеотидный или непонуклеотидный

фрагмент ковалентно присоединен к антисмысловому олигомеру посредством ковалентной связи.

[13] В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антисмыслового олигонуклеотида SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19, как показано на **ФИГ. 18А**, и средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10, 5-CNAC или его соль, гидрат или сольват или их комбинация), при этом конъюгат антисмыслового олигонуклеотида нацелен на РНК, кодирующую PCSK9. В некоторых аспектах, РНК представляет собой пре-мРНК, сплайсинг вариант пре-мРНК, зрелую мРНК или ее аллельный вариант или мутант. В некоторых аспектах, антисмысловой олигомер нацелен на последовательность внутри экзона. В некоторых аспектах, антисмысловой олигомер нацелен на последовательность внутри интрона. В некоторых аспектах, антисмысловой олигомер нацелен на последовательность, содержащую соединение между экзоном и интроном. В некоторых аспектах, антисмысловой олигомер нацелен на последовательность выше 5'-конца открытой рамки считывания, кодирующей PCSK9. В некоторых аспектах, антисмысловой олигомер нацелен на последовательность ниже 3'-конца открытой рамки считывания, кодирующей PCSK9.

[14] В некоторых аспектах, фармацевтическая композиция, раскрытая в настоящем документе, дополнительно содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый наполнитель или их комбинацию. В некоторых аспектах, по меньшей мере один фармацевтически приемлемый наполнитель или их комбинация выбраны из группы, состоящей из регулятора уровня рН, консерванта, вкусового агента; агента, маскирующего вкус; ароматизатора; увлажнителя; тонизирующего средства; красителя; поверхностно-активного вещества; пластификатора; смазки; вспомогательного средства для улучшения текучести; компрессионного средства; солубилизатора; вспомогательного вещества; разбавителя; соли фосфатного буфера; лимонной кислоты, гликоля, диспергатора, кроссповидона, повидона или любой их комбинации. В некоторых аспектах, фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем документе, дополнительно содержат терапевтический агент, выбранный из группы, состоящей из статина, смолы, связывающей желчь, никотиновой кислоты, производного фибриновой кислоты, пробукола, неомицина, декстротироксина, растительного станолювого эфира, ингибитора абсорбции холестерина, имплитапида, ингибитора переносчиков желчных кислот, регулятор печеночного СYP7a, заместительного эстрогенного терапевтического средства, противовоспалительного средства или их комбинации. В некоторых аспектах, статин

выбирают из группы, состоящей из ловастатина, церивастатина, правастатина, аторвастатина, симвастатина, розувастатина, флувастатина и их комбинации.

**[15]** В настоящем изобретении также предложен способ лечения заболевания или состояния, вызванного аномальными уровнями экспрессии и/или активности PCSK9 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции, раскрытой в настоящем документе, например, композиции, содержащей конъюгат антисмыслового олигонуклеотида по настоящему изобретению (например, CIVI 008) и средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10, 5-CNAC или его соль, гидрат или сольват или их комбинация), при этом введение фармацевтической композиции снижает уровень PCSK9 в сыворотке и/или снижает уровень холестерина ЛПНП в сыворотке у субъекта. В некоторых аспектах, PCSK9 представляет собой (i) аллельный вариант PCSK9; (ii) мутант PCSK9; или (iii) сплайс-вариант PCSK9. В некоторых аспектах, мутант PCSK9 представляет собой мутант с приобретением функции PCSK9.

**[16]** В некоторых аспектах, заболевание или состояние выбирают из группы, состоящей из атеросклероза, гиперхолестеринемии, дисбаланса холестерина ЛПВП/ЛПНП, дислипидемии, заболевания коронарных артерий (CAD) и ишемической болезни сердца (CHD). В некоторых аспектах, дислипидемия представляет собой наследственную гиперлипидемию (FCHL) или приобретенную гиперлипидемию. В некоторых аспектах, гиперхолестеринемия представляет собой обычную гиперхолестеринемию или резистентную к статинам гиперхолестеринемию.

**[17]** В некоторых аспектах, способы лечения, раскрытые в настоящем документе, дополнительно включают введение терапевтического средства, выбранного из группы, состоящей из статина, смолы, связывающей желчь, никотиновой кислоты, производного фибриновой кислоты, пробукола, неомицина, декстротироксина, растительного станолювого эфира, ингибитора абсорбции холестерина, имплитапида, ингибитора переносчиков желчных кислот, регулятор печеночного CYP7a, заместительного эстрогенного терапевтического средства, противовоспалительного средства или их комбинации. В некоторых аспектах, статин выбирают из группы, состоящей из ловастатина, церивастатина, правастатина, аторвастатина, симвастатина, розувастатина, флувастатина и их комбинации.

**[18]** В некоторых аспектах, фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем документе, вводят перорально. В некоторых аспектах, фармацевтическую композицию

вводят в виде однократной дозы. В некоторых аспектах, фармацевтическую композицию вводят в виде нескольких доз.

**[19]** Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения расстройства, выбранного из группы, состоящей из атеросклероза, гиперлипидемии, гиперхолестеринемии, дисбаланса холестерина ЛПВП/ЛПНП, САД и СНД у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение эффективного количества фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, например, композиции, содержащей конъюгат антисмыслового олигонуклеотида настоящего изобретения (например, CIVI 008) и усилитель пероральной доставки (например, SNAC, C10, 5-CNAC, или его соль, гидрат или сольват, или их комбинация) субъекту.

**[20]** В настоящем изобретении также предложен способ снижения уровня экспрессии и/или активности PCSK9 в клетке *in vitro* или *in vivo*, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции, раскрытой в настоящем документе, например, композиции, содержащей конъюгат антисмыслового олигонуклеотида настоящего описания (например, CIVI 008) и усилитель пероральной доставки (например, SNAC, C10, 5-CNAC или его соль, гидрат или сольват или их комбинация) в клетку.

**[21]** Также предложен способ снижения уровней экспрессии PCSK9 и/или активности PCSK9 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции, раскрытой в настоящем документе, например, композиции, содержащей конъюгат антисмыслового олигонуклеотида настоящего описания (например, CIVI 008) и усилитель пероральной доставки (например, SNAC, C10, 5-CNAC или его соль, гидрат или сольват или их комбинация) субъекту.

**[22]** Настоящее изобретение также обеспечивает способ снижения уровня холестерина у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, раскрытой в настоящем документе, например, композиции, содержащей конъюгат антисмыслового олигонуклеотида настоящего описания (например, CIVI 008) и усилитель пероральной доставки (например, SNAC, C10, 5-CNAC или его соль, гидрат или сольват или их комбинация).

**[23]** Также предложен способ получения фармацевтической композиции, включающий смешивание (i) антисмыслового олигомера длиной от 16 до 22 последовательных нуклеотидов, при этом последовательность антисмыслового олигомера включает непрерывную последовательность длиной 16 нуклеотидов, которая на 100%

комплементарна последовательности SEQ ID NO: 31, где антисмысловой олигомер представляет собой гэдмер, содержащий по меньшей мере одно звено LNA, и при этом антисмысловой олигомер нацелен на РНК, кодирующую PCSK9; и (ii) средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10, 5-CNAC или его соль, гидрат или сольват или их комбинация).

**[24]** В настоящем изобретении также предложен способ получения фармацевтической композиции, включающий смешивание (i) конъюгата, содержащего (а) антисмысловой олигомер, состоящий из 16-22 последовательных нуклеотидов, при этом последовательность антисмыслового олигомера содержит непрерывную последовательность длиной 16 нуклеотидов, которая на 100% комплементарна последовательности SEQ ID NO: 31, и при этом антисмысловой олигомер представляет собой гэдмер, содержащий по меньшей мере одно звено LNA, и (б) по меньшей мере один нуклеотидный или неполинуклеотидный фрагмент, ковалентно присоединенный к указанному антисмысловому олигомеру непосредственно или через линкер, расположенный между непрерывной последовательностью олигомера и нуклеотидной или неполинуклеотидной частью, при этом конъюгат антисмыслового олигонуклеотида нацелен на РНК, кодирующую PCSK9; и (ii) средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10, 5-CNAC или его соль, гидрат или сольват или их комбинация).

**[25]** В некоторых аспектах, последовательность антисмыслового олигомера содержит или состоит из SEQ ID NO: 26, т.е. последовательности, на 100% комплементарной SEQ ID NO: 31, имеющей ту же длину, что и SEQ ID NO: 31. В некоторых аспектах, последовательность антисмыслового олигомера содержит или состоит из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, то есть последовательности, имеющей последовательность оснований SEQ ID NO: 26, но с определенным набором модификаций оснований и скелета. В некоторых аспектах, конъюгат антисмыслового олигомера содержит или состоит из SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19, то есть SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, конъюгированных с фрагментом GalNAc2.

**[26]** В некоторых аспектах фармацевтических композиций и способов настоящего изобретения. средство для пероральной доставки содержит, например, каприловую кислоту (C8), каприновую кислоту (C10), их производное, их фармацевтически приемлемый гидрат, сольват или соль, или любую их комбинацию. В некоторых аспектах, фармацевтически приемлемая соль представляет собой соль натрия, соль калия или их комбинацию. В некоторых аспектах, фармацевтическая композиция является твердой.

[27] В некоторых аспектах, фармацевтическая композиция находится в форме таблетки или капсулы. В некоторых аспектах, капсула представляет собой жидкую капсулу. В некоторых аспектах, фармацевтическая композиция имеет энтеросолюбильное покрытие. В некоторых аспектах, таблетка или капсула покрыта энтеросолюбильным покрытием. В некоторых аспектах, таблетка или капсула имеет массу от 5 до 1000 мг, от 10 до 500 мг, от 10 до 250 мг, от 100 до 200 мг или от 250 до 500 мг. В некоторых аспектах, количество антисмыслового олигомера или конъюгата антисмыслового олигонуклеотида в таблетке или капсуле находится в диапазоне от 1 мг до 100 мг, от 5 мг до 100 мг, от 10 мг до 100 мг, от 20 мг до 100 мг, от 20 мг до 50 мг.

[28] В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки представляет собой соль, гидрат или сольват N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты или их комбинацию. В некоторых аспектах, соль N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты выбрана из группы, состоящей из натриевой соли, калиевой соли, кальциевой соли N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты и любой их комбинации. В некоторых аспектах, соль N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты представляет собой натриевую соль. В некоторых аспектах, соль N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты представляет собой моонатриевую соль (салькапрозат натрия 203787-91-1, SNAC, 8-(2-гидроксибензамидо)октаноат натрия). В некоторых аспектах, соль N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты представляет собой динатриевую соль.

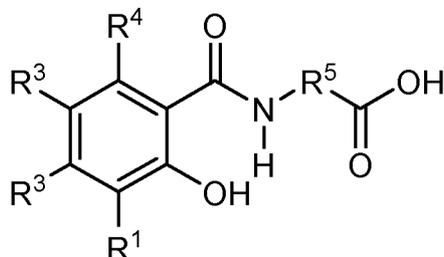
[29] В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки представляет собой соль, гидрат или сольват N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты или их комбинацию. В некоторых аспектах, соль N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты выбрана из группы, состоящей из натриевой соли, калиевой соли, кальциевой соли N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты, и любой их комбинации. В некоторых аспектах, соль N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты представляет собой натриевую соль. В некоторых аспектах, соль N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприла представляет собой моонатриевую соль (5-SNAC). В некоторых аспектах, соль N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприла представляет собой динатриевую соль.

[30] В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки представляет собой соль, гидрат или сольват каприновой кислоты (C10) или их комбинацию. В некоторых аспектах, соль каприновой кислоты (C10) выбрана из группы, состоящей из соли натрия, соли калия и соли кальция каприновой кислоты (C10) и любой их комбинации. В некоторых аспектах, соль каприновой кислоты (C10) представляет собой капрат натрия.



некоторых аспектах, пилюля или капсула содержит CIVI 008 и C10. В некоторых аспектах, пилюля или капсула содержат CIVI 008 и 5-CNAC.

**[35]** В некоторых аспектах композиций и способов, раскрытых в настоящем документе, средство для пероральной доставки представляет собой



где

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  и  $R^4$  представляют собой независимо водород,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NR}^6\text{R}^7$ , галоген,  $\text{C}_1\text{-C}_4$  алкил или  $\text{C}_1\text{-C}_4$  алкокси;

$R^5$  представляет собой замещенный или незамещенный  $\text{C}_2\text{-C}_{16}$  алкилен, замещенный или незамещенный  $\text{C}_2\text{-C}_{16}$  алкенилен, замещенный или незамещенный  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$  алкил(арилен), или замещенный или незамещенный арил( $\text{C}_1\text{-C}_4$  алкилен); и

$R^6$  и  $R^7$  представляют собой независимо водород, кислород или  $\text{C}_1\text{-C}_4$  алкил.

**[36]** В некоторых аспектах композиций и способов, раскрытых в настоящем документе, средство для пероральной доставки выбран из группы, состоящей из N-(8-[2-гидроксибензоил]амино)каприловой кислоты (SNAC), N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты (5-CNAC), N-(10-[2-гидроксибензоил]амино)декановой кислоты (SNAD), 4-[(4-хлор-2-гидроксибензоил)амино]бутановой кислоты (4-CNAB), N-(8-[4-метокси-хлор-2-гидроксибензоил]амино)октановой кислоты (4-МОАС), 8-(4-гидроксифенокси)октановой кислоты (4-НРО), 4-м-толилоксимасляной кислоты (3-ТВА), 4-(3-гидроксифенилсульфанил)масляной кислоты (3-НПСВ), 5-фенилпентановой кислоты (5-РРА), 8-(2-гидроксифенокси)октилдиэтанолamina (2-НРОД), (4-изопропилбензилокси)уксусной кислоты (4-ИВОА), 2-(5-пентановая кислота)-5-(2-гидроксифенил)-1,3,4-оксадиазола (2-РНОД), 7-оксо-7-фенилгептановой кислоты (7-ОРНА), 4-(3-фторфенилсульфанил)масляной кислоты (3-ФПСВ) или любой их комбинации.

**[37]** В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки представляет собой динатриевую соль N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты.

**[38]** В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки представляет собой соль, гидрат или сольват N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты или их комбинацию. В некоторых аспектах, соль N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой

кислоты выбрана из группы, состоящей из натриевой соли, калиевой соли, кальциевой соли N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты и любой их комбинации. В некоторых аспектах, соль N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты представляет собой натриевую соль. В некоторых аспектах, соль N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты представляет собой моонатриевую соль. В некоторых аспектах, соль N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты представляет собой динатриевую соль.

**[39]** Настоящее изобретение также обеспечивает капсулу, содержащую (i) композицию, содержащую CIVI 008, и (ii) композицию, содержащую 5-CNAC. В некоторых аспектах, композиция, содержащая CIVI 008, и композиция, содержащая 5-CNAC, представляют собой сухую смесь. В некоторых аспектах, капсула представляет собой желатиновую капсулу. В некоторых аспектах, гелевая капсула представляет собой желатиновую капсулу с твердой оболочкой. В некоторых аспектах, капсула покрыта энтеросолюбильным покрытием. В некоторых аспектах, капсула содержит от 5 до 30 мг CIVI 008 и от 100 до 200 мг 5-CNAC. В некоторых аспектах, капсула содержит около 5 мг, около 10 мг, около 20 мг, около 25 мг или около 30 мг CIVI 008. В некоторых аспектах, капсула содержит: 10 мг CIVI 008 и 100 мг 5-CNAC; 20 мг CIVI 008 и 200 мг 5-CNAC; 5 мг CIVI 008 и 200 мг 5-CNAC; 10 мг CIVI 008 и 200 мг 5-CNAC; 25 мг CIVI 008 и 200 мг 5-CNAC; или 30 мг CIVI 008 и 200 мг 5-CNAC. В некоторых аспектах, капсула содержит статин.

**[40]** В некоторых аспектах, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения расстройства, выбранного из группы, состоящей из атеросклероза, гиперлипидемии, гиперхолестеринемии, дисбаланса холестерина ЛПВП/ЛПНП, САД или СНД у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ, включает введение субъекту капсулы, содержащей (i) композицию, содержащую CIVI 008, и (ii) композицию, содержащую 5-CNAC. В настоящем изобретении также предложен способ снижения уровней экспрессии и/или активности PCSK9 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту капсулы, содержащей (i) композицию, содержащую CIVI 008, и (ii) композицию, содержащую 5-CNAC. Также предложен способ снижения уровня холестерина у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту капсулы, содержащей (i) композицию, содержащую CIVI 008, и (ii) композицию, содержащую 5-CNAC. Также предложена капсула, содержащая: (i) композицию, содержащую CIVI 008, и (ii) композицию, содержащую 5-CNAC, для применения при лечении расстройства, выбранного из группы, состоящей из атеросклероза, гиперлипидемии,

гиперхолестеринемии, дисбаланса холестерина ЛПВП/ЛПНП, CAD или CHD. Также предлагается капсула, содержащая: (i) композицию, содержащую CIVI 008, и (ii) композицию, содержащую 5-CNAC, для применения в качестве лекарственного средства для снижения уровней экспрессии и/или активности PCSK9 у субъекта. Настоящее изобретение также обеспечивает капсулу, содержащую (i) композицию, содержащую CIVI 008, и (ii) композицию, содержащую 5-CNAC, для применения в качестве лекарственного средства для снижения уровня холестерина у субъекта. Также предложен способ получения капсулы, содержащей композицию, содержащую CIVI 008, и композицию, содержащую 5-CNAC, включающий: (i) сухое смешивание первой композиции, содержащей CIVI 008, и второй композиции, содержащей 5-CNAC; и (ii) инкапсулирование полученной сухой смеси со стадии (i) в капсулу.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ/ФИГУР

[41] На **ФИГ. 1А, 1В** и **1С** показаны примеры конъюгатов три-GalNAc, которые можно использовать в пероральных композициях, раскрытых в настоящем документе. Конъюгаты 1-4 иллюстрируют четыре подходящих фрагмента конъюгата GalNAc, а конъюгаты 1a-4a относятся к тем же конъюгатам с дополнительным линкерным фрагментом (Y), который используется для связывания конъюгата с олигомером (область А или с биорасщепляемым линкером, например, область В). Волнистая линия представляет собой ковалентную связь с олигомером.

[42] На **ФИГ. 2** показаны примеры фрагментов конъюгатов холестерина и токоферола, которые можно использовать в пероральных композициях, раскрытых в настоящем документе. Конъюгаты 5a и 6a относятся к одним и тем же конъюгатам с дополнительным линкерным фрагментом (Y), который используется для связывания конъюгата с олигомером (область А или биорасщепляемый линкер, такой как область В). Волнистая линия представляет собой ковалентную связь с олигомером.

[43] На **ФИГ. 3** показаны конкретные соединения LNA. Бета-D-окси LNA обозначаются верхним индексом L после буквы, нижний индекс s представляет фосфотиоатную связь, верхний индекс Me перед заглавной C представляет собой 5-метилцитозин LNA, нуклеотиды, не являющиеся LNA, представляют собой нуклеотиды ДНК (без верхнего индекса L).

[44] На **ФИГ. 4** показаны примеры конъюгатов холестерина и LNA соединений, которые можно использовать в пероральных композициях, раскрытых в настоящем

документе. Бета-D-окси LNA обозначаются верхним индексом L после буквы, нижний индекс s представляет фосфоротиоатную связь, нижний индекс o представляет фосфодиэфирную связь, верхний индекс Me перед заглавной C представляет собой 5-метилцитозинный LNA, нуклеотиды, не относящиеся к LNA, представляют собой нуклеотиды ДНК (без верхнего индекса L).

[45] На **ФИГ. 5A** показаны примеры конъюгатов GalNAc и LNA соединений, которые можно использовать в пероральных композициях, раскрытых в настоящем документе. Конъюгаты по существу соответствуют Conj2a на **ФИГ. 1**, где волнистая линия заменена олигомером LNA. Бета-D-окси LNA обозначаются верхним индексом L после буквы, нижний индекс s представляет фосфоротиоатную связь, верхний индекс Me перед заглавной C представляет собой 5-метилцитозинный LNA, нуклеотиды, не являющиеся LNA, представляют собой нуклеотиды ДНК (без верхнего индекса L).

[46] На **ФИГ. 5B** показана детальная структура SEQ ID NO 18.

[47] На **ФИГ. 5C** показана детальная структура SEQ ID NO 19.

[48] На **ФИГ. 6** показан пример группы конъюгата FAM.

[49] На **ФИГ. 7** показаны конъюгаты LNA-FAM с расщепляемыми фосфодиэфирными связями и без них. Бета-D-окси LNA обозначаются верхним индексом L после буквы, нижний индекс s представляет фосфоротиоатную связь, нижний индекс o представляет фосфодиэфирную связь, верхний индекс Me перед заглавной C представляет собой 5-метилцитозинный LNA, нуклеотиды, не относящиеся к LNA, представляют собой нуклеотиды ДНК (без верхнего индекса L).

[50] На **ФИГ. 8** показаны гэммеры анти-PCSK9, ранжированные в соответствии с активностью *in vitro*.

[51] На **ФИГ. 9** показаны выбранные гэммеры анти-PCSK9, ранжированные в соответствии с активностью *in vitro*.

[52] На **ФИГ. 10** показана активность *in vitro* выбранных соединений анти-PCSK9 и данные IC<sub>50</sub>.

[53] На **ФИГ. 11** показаны уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ) *in vivo* для выбранных конъюгатов анти-PCSK9.

[54] На **ФИГ. 12** показано, что межнуклеозидная связь L может быть, например, фосфодиэфирной, фосфоротиоатной, фосфородитиоатной, боранофосфатной или метилфосфонатной, такой как фосфодиэфирная. PO представляет собой фосфодиэфирную связь. Соединение (а) имеет область В с одной ДНК (или РНК), связь между второй и первой областью представляет собой PO. Соединение (б) имеет два ДНК/РНК (таких как

ДНК) нуклеозида, связанных фосфодиэфирной связью. Соединение (с) имеет три нуклеозида ДНК/РНК (такие как ДНК), связанные фосфодиэфирными связями. В некоторых аспектах, область В может быть дополнительно расширена за счет дополнительных фосфодиэфирных ДНК/РНК (таких как нуклеозиды ДНК). Группа конъюгата (обозначенная X, иначе область С в настоящем документе) показана слева от каждого соединения (например, холестерол, GalNAc, Conj1-4, 1a-4a и 5 или 6) и необязательно может быть ковалентно присоединена к концевому нуклеозиду области В через фосфор нуклеозидной связывающей группы, такой как фосфодиэфирная, фосфоротиоатная, фосфородитиоатная, боранофосфатная, фосфорамидатная или метилфосфонатная, или может быть связана альтернативной связью, например триазольная связь (см. L в соединениях d, e и f).

**[55]** На **ФИГ. 13** показано, где соединения содержат необязательный линкер (Y) между третьей (конъюгированной) областью (X) и второй областью (область В), используя номенклатуру, представленную на **ФИГ. 12**. Подходящие линкеры раскрыты в настоящем документе и включают, например, алкильные линкеры, такие как линкеры С6. В соединениях а), б) и в) линкер между X и участком В присоединен к участку В через фосфор нуклеозидной связывающей группы, такой как фосфодиэфирная, фосфоротиоатная, фосфородитиоатная, боранофосфатная, фосфорамидатная или метилфосфонатная, или может быть связан через альтернативную связь, например, триазольную связь (Li). В этих соединениях Li<sub>i</sub> представляет собой межнуклеозидную связь между первой (А) и второй областями (В). Соединения г), д) и е) дополнительно содержат линкер (Y) между областью В и группой конъюгата, и участок Y может быть связан с областью В через, например, фосфор нуклеозидной связывающей группы, такой как фосфодиэфирная, фосфоротиоатная, фосфородитиоатная, фосфорамидатная, боранофосфатная или метилфосфонатная связь или, в некоторых аспектах, триазольную связь. В дополнение или альтернативно X может представлять собой активационную группу или реакционноспособную группу. X может быть ковалентно присоединен к области В через фосфор нуклеозидной связывающей группы, такой как фосфодиэфирная, фосфоротиоатная, фосфорамидатная, фосфородитиоатная, боранофосфатная или метилфосфонатная, или может быть присоединен через альтернативную связь, например, через триазольную связь.

**[56]** На **ФИГ. 14** показано *in vivo* сайленсинг мРНК PCSK9 после введения конъюгатов холестерина. Мышам вводили однократную дозу 10 мг/кг неконъюгированного антисмыслового олигонуклеотида LNA (#40) или эквимольных количеств

антисмысловых олигонуклеотидов LNA, конъюгированных с холестерином с различными линкерами, и умерщвляли на 1, 3, 7 и 10 день после введения дозы. РНК выделяли из печени и почек и подвергали специфичной для PCSK9 РВ-кПЦР. На панели А показано количественное определение мРНК PCSK9 из образцов печени, нормализованное по ВАСТ, и показанное в процентах от среднего эквивалентного контроля с физиологическим раствором. Панель В показывает, что количественная оценка мРНК PCSK9 из образцов почек была нормализована к ВАСТ и показана в процентах от среднего эквивалентного контроля с физиологическим раствором.

[57] На **ФИГ. 15** показана экспрессия Kim-1 из исследования безопасности на крысах (см. Пример 5).

[58] На **ФИГ. 16** показан сывороточный PCSK9 и холестерин ЛПНП в образцах яванских макаков, которым четыре раза (одна инъекция в неделю) вводили 0,5 мг/кг/неделю или 1,5 мг/кг/неделю SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:18.

[59] На **ФИГ. 17** показан сывороточный PCSK9 и холестерин ЛПНП в образцах яванских макаков, которым четыре раза (одна инъекция в неделю) вводили 0,5 или 1,5 мг/кг/неделю SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 19.

[60] На **ФИГ. 18А** схематично показаны структуры конъюгатов антисмысловых олигонуклеотидов SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19.

[61] На **ФИГ. 18В** показана подробная химическая структура и полное название конъюгата антисмысловых олигонуклеотидов CIVI 008 (цепадакурсен).

[62] На **ФИГ. 19** показаны химические структуры типичных средств для пероральной доставки.

[63] На **ФИГ. 20** показан дизайн клинического исследования, представленного в Примере 9.

[64] На **ФИГ. 21** показаны уровни концентрации CIVI 008 в плазме после введения с SNAC или без него.

[65] На **ФИГ. 22** показаны уровни AUC в плазме в группе ПК (подкожно) (P0001, P0002, P0901 и P0902) и ПО (перорально) в группе исследования Примера 9 (P0301, P0302, P0303, P1201, P1202, P1203, P0401, P0402, P0403, P1301, P1302, P1303, P0501 и P1401).

[66] На **ФИГ. 23** показаны уровни концентрации CIVI 008 в печени в группах ПК и ПО исследования, представленного в Примере 9.

[67] На **ФИГ. 24** показаны средние изменения уровней экспрессии PCSK9 по отношению к исходному уровню на 35 и 42 день после перорального введения CIVI 008.

[68] На **ФИГ. 25А** и **25В** показаны изменения уровней холестерина ЛПНП в плазме по отношению к исходному уровню после введения одной или двух капсул CIVI 008 (**ФИГ. 25А**) или в контрольных условиях (**ФИГ. 25В**).

[69] На **ФИГ. 26** показаны изменения уровней холестерина ЛПНП в плазме по отношению к исходному уровню во время исследования, представленного в Примере 9.

[70] На **ФИГ. 27** показано схематическое описание исследования, представленного в Примере 11.

[71] На **ФИГ. 28** показаны уровни концентрации CIVI 008 в плазме после введения с 5-CNAC.

[72] На **ФИГ. 29** показано сравнение фармакокинетических параметров (средняя  $AUC_{0-5}$  и средняя  $C_{max}$ ), соответствующих введению капсул CIVI 008, содержащих либо SNAC, либо 5-CNAC.

[73] На **ФИГ. 30** показаны уровни концентрации в плазме и фармакокинетические параметры (средняя  $AUC_{0-5}$  и средняя  $C_{max}$ ), соответствующие введению CIVI 008 с 5-CNAC в капсулах размера 4 (группа А) или капсулах размера 0 (группа В).

[74] На **ФИГ. 31** показаны средние значения AUC и средние значения  $C_{max}$  в дни 1 и 3 у обезьян, которым вводили от 5 до 30 мг CIVI 008, приготовленного с 5-CNAC.

[75] На **ФИГ. 32А** и **ФИГ. 32В** показано сравнение средних фармакокинетических параметров в день 1 и 3 у обезьян, которым вводили аналогичные дозы CIVI 008 в капсулах, приготовленных либо сухим смешиванием (**ФИГ. 32А**), либо лиофилизацией (**ФИГ. 32В**).

[76] На **ФИГ. 33** показано снижение по сравнению с исходным уровнем PCSK9 и ЛПНП в плазме через 22 дня дозирования.

[77] На **ФИГ. 34** показан % снижения ЛПНП по сравнению с исходным уровнем у обезьян, которым вводили CIVI 008, приготовленный либо с SNAC, либо с 5-CNAC.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[78] Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям для пероральной доставки, содержащим антисмысловой олигомер (например, антисмысловой олигонуклеотид) или конъюгат антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008) и средство для пероральной доставки, например, C10, SNAC или 5-CNAC. В некоторых аспектах, антисмысловой олигомер имеет длину от 16 до 22 последовательных нуклеотидов, а его последовательность содержит непрерывную последовательность

длиной 16 нуклеотидов, которая на 100% комплементарна целевой последовательности PCSK9 SEQ ID NO: 31, где антисмысловой олигомер представляет собой гэтмер, содержащий по меньшей мере одно звено LNA, и при этом антисмысловой олигомер нацелен на РНК, кодирующую PCSK9.

**[79]** В некоторых аспектах, олигомер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19. В некоторых аспектах, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида содержит (i) фрагмент антисмыслового олигомера, который имеет длину от 16 до 22 последовательных нуклеотидов, при этом его последовательность содержит непрерывную последовательность длиной 16 нуклеотидов, которая на 100% комплементарна целевой последовательности PCSK9 SEQ ID NO: 31, где антисмысловой олигомер представляет собой гэтмер, содержащий по меньшей мере одно звено LNA, и при этом антисмысловой олигомер нацеливается на РНК, кодирующую PCSK9, и (ii) фрагмент GalNAc, конъюгированный с 5'-концом олигомера. В некоторых аспектах, антисмысловой олигонуклеотидный конъюгат представляет собой CIVI 008, как показано на **ФИГ. 18В**.

**[80]** Фармацевтические композиции для перорального введения, раскрытые в настоящем документе, например, композиции, содержащие CIVI 008, например, в форме пилюль или капсул, содержат по меньшей мере одно средство для пероральной доставки, которое защищает полезную нагрузку (например, CIVI 008) во время прохождения через желудочно-кишечный тракт (например, через желудок и верхнюю часть тонкого кишечника). В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки представляет собой соль (например, натриевую соль) жирной кислоты, такой как каприловая кислота (октановая кислота, C8), каприновая кислота (декановая кислота или дециловая кислота, C10), их производное (например, 8-[2-гидроксибензоил]амино)каприловая кислота, SNAC или 5-CNAC) или их комбинация. В конкретном аспекте, средство для пероральной доставки представляет собой соль, например, натриевую соль SNAC или натриевую соль 5-CNAC.

**[81]** Также предложены способы получения описанных в настоящем документе фармацевтических композиций. В описании также представлены способы лечения субъекта, если в этом есть необходимость, включающие введение пероральных фармацевтических композиций, раскрытых в настоящем документе.

## **Определения**

**[82]** Для облегчения понимания настоящего описания сначала даны определения некоторых терминов. Дополнительные определения приведены на протяжении всего подробного описания.

**[83]** Следует отметить, что термины в единственном числе относятся к одному или нескольким из этих объектов; например, «последовательность нуклеотидов» понимается как представляющая одну или несколько последовательностей нуклеотидов. Таким образом, термины в единственном числе, «один или несколько» и «по меньшей мере один» могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо.

**[84]** Кроме того, термин «и/или», используемый в настоящем документе, следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе или без другого. Таким образом, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А и/или В» в настоящем документе, подразумевает включение «А и В», «А или В», «А» (отдельно) и «В» (отдельно). Аналогично, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А, В и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно).

**[85]** Понятно, что всякий раз, когда аспекты описываются в настоящем документе с использованием формулировки «содержащий», в противном случае также предоставляются аналогичные аспекты, описанные с использованием терминов «состоящий из» и/или «состоящий по существу из».

**[86]** Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится данное описание. Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; and the Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, предоставляют специалисту общий словарь многих терминов, используемых в этом описании.

**[87]** Единицы, префиксы и символы обозначаются в их принятой Международной системой единиц (СИ) форме. Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, нуклеотидные последовательности записываются слева направо в ориентации от 5' к 3'. Аминокислотные последовательности записываются слева направо в амино-карбоксильной ориентации. Представленные в настоящем документе заголовки не являются ограничениями различных аспектов раскрытия, которые могут быть получены путем ссылки на описание в целом. Соответственно, термины,

определенные непосредственно ниже, более полно определены посредством ссылки на описание в целом.

**[88]** Термин «около» используется в настоящем документе для обозначения примерно, в рамках, приблизительно или в областях. Когда термин «около» используется в комбинации с числовым диапазоном, он модифицирует этот диапазон, расширяя границы выше и ниже установленных числовых значений. В общем, термин «около» может модифицировать числовое значение выше и ниже указанного значения с отклонением, например, на 10 процентов, вверх или вниз (выше или ниже). Например, если утверждается, что антисмысловой олигомер или конъюгат антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008) снижает экспрессию белка PCSK9 в клетке после введения олигомера или конъюгата по меньшей мере на около 60%, подразумевается, что экспрессия PCSK9 уровни снижаются в диапазоне от 50% до 70%.

**[89]** Термины «олигомер» или «олигонуклеотид» в контексте настоящего описания используются взаимозаменяемо и относятся к молекуле, образованной ковалентной связью двух или более нуклеотидов. В настоящем документе один нуклеотид (звено) также может называться мономером или звеном.

**[90]** Используемый в настоящем документе термин «производное» относится к химическому соединению, структурно родственному соединению, описанному в настоящем документе (например, C10, SNAC или 5-CNAC), например, к соединению, имеющему такой же углеродный скелет, но химически модифицированному для введения, например, боковой цепи или группы, описанной в настоящем документе, в одно или несколько положений, и при этом производное обладает биологической активностью (либо способностью функционировать в качестве средства для пероральной доставки), которая по существу аналогична биологической активности объекта или молекула это производное.

**[91]** Термин «нуклеотид», используемый в настоящем документе, относится к гликозиду, содержащему сахарную часть, основную часть и ковалентно связывающую группу (группу связи), такую как фосфатная или фосфоротиоатная межнуклеозидная связывающая группа, и охватывает оба встречающихся в природе нуклеотида, такие как ДНК или РНК, и не встречающиеся в природе нуклеотиды, содержащие модифицированные фрагменты сахара и/или основания, которые также упоминаются в настоящем документе как «аналоги нуклеотидов». В настоящем документе один нуклеотид может называться мономером или звеном. В некоторых аспектах, термин «аналоги нуклеотидов» относится к нуклеотидам, имеющим модифицированные сахарные

фрагменты. Неограничивающие примеры нуклеотидов, содержащих модифицированные сахарные фрагменты (например, LNA), раскрыты в другом месте настоящего документа. В других аспектах, термин «аналоги нуклеотидов» относится к нуклеотидам, имеющим модифицированные фрагменты азотистых оснований. Нуклеотиды с модифицированными фрагментами азотистых оснований включают, но не ограничиваются ими, 5-метилцитозин, изоцитозин, псевдоизоцитозин, 5-бромурацил, 5-пропинилурацил, 6-аминопурин, 2-аминопурин, инозин, диаминопурин и 2-хлор-6-аминопурин. В некоторых аспектах, термины «нуклеотид», «звено» и «мономер» используются взаимозаменяемо. Следует понимать, что когда речь идет о последовательности нуклеотидов или мономеров, имеется в виду последовательность оснований, таких как А, Т, G, С или U, и их аналоги.

**[92]** Термин «нуклеозид», используемый в настоящем документе, используется для обозначения гликозида, включающего сахарную часть и основную часть, и, следовательно, может использоваться в отношении нуклеотидных звеньев, которые ковалентно связаны межнуклеозидными связями между нуклеотидами олигомера (например, антисмыслового олигомера, АСО) или конъюгата антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008), раскрытых в настоящем документе. В области биотехнологии термин «нуклеотид» часто используется для обозначения мономера или звена нуклеиновой кислоты. В контексте олигомера (например, антисмыслового олигомера, АСО) или конъюгата антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008), раскрытых в настоящем документе, термин «нуклеотид» может относиться только к основанию, т. е. последовательности азотистых оснований, содержащей цитозин (ДНК и РНК), гуанин (ДНК и РНК), аденин (ДНК и РНК), тимин (ДНК) и урацил (РНК), в которых неявно присутствует сахарный остов и межнуклеозидные связи. Подобным образом, особенно в случае олигонуклеотидов, в которых модифицированы одна или несколько групп межнуклеозидной связи, термин «нуклеотид» может относиться к «нуклеозиду». Например, термин «нуклеотид» можно использовать даже при указании наличия или характера связей между нуклеозидами.

**[93]** В некоторых аспектах, термины «нуклеозид», «нуклеотид», «звено» и «мономер» используются взаимозаменяемо. Следует понимать, что когда речь идет о последовательности нуклеотидов или мономеров, имеется в виду последовательность оснований, таких как А, Т, G, С или U.

**[94]** Термины «нуклеиновые кислоты» или «нуклеотиды» во множественном числе охватывают множество нуклеиновых кислот. В некоторых аспектах, термин

«нуклеиновые кислоты» или «нуклеотиды» относится к целевой последовательности, например, пре-мРНК, мРНК или ДНК *in vivo* или *in vitro*. Когда этот термин относится к нуклеиновым кислотам или нуклеотидам в целевой последовательности, нуклеиновые кислоты или нуклеотиды могут быть естественными последовательностями внутри клетки. В других аспектах, «нуклеиновые кислоты» или «нуклеотиды» относятся к последовательности в олигомере или конъюгате согласно настоящему изобретению. Когда термин относится к последовательности в олигомере (например, антисмысловом олигомере, АСО) или конъюгате антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008), раскрытых в настоящем документе, нуклеиновые кислоты или нуклеотиды могут быть не встречающимися в природе, т. е. химически синтезированными, ферментативно продуцируемыми, рекомбинантно продуцируемыми или любая их комбинация. В некоторых аспектах, нуклеиновые кислоты или нуклеотиды в олигомере (например, антисмысловом олигомере, АСО) или конъюгате антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008), раскрытых в настоящем документе, получены синтетическим или рекомбинантным путем, но не являются встречающейся в природе последовательностью или ее фрагментом. В некоторых аспектах, нуклеиновые кислоты или нуклеотиды в олигомере (например, антисмысловом олигомере, АСО) или конъюгате антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008), раскрытых в настоящем документе, не встречаются в природе, поскольку они содержат по меньшей мере один аналог нуклеозида, который не встречается в природе.

**[95]** Термины «обратный комплемент» и «обратная комплементарность», используемые в настоящем документе, взаимозаменяемы с терминами «комплемент» и «комплементарность».

**[96]** Термин «комплементарный» означает, что две последовательности являются комплементарными, когда последовательность одной может связываться с последовательностью другой в антипараллельном смысле, при этом 3'-конец каждой последовательности связывается с 5'-концом другой последовательности, и каждый А, Т(У), G и С одной последовательности затем выравнивается с Т(У), А, С и G, соответственно, другой последовательности. Как правило, комплементарная последовательность олигонуклеотида имеет по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, наиболее предпочтительно 100% комплементарность определенной последовательности.

**[97]** Термины «соответствующий аналог нуклеотида» и «соответствующий нуклеотид» предназначены для обозначения того, что нуклеотид в аналоге нуклеотида и встречающийся в природе нуклеотид идентичны. Например, когда звено 2-дезоксирибозы

нуклеотида связано с аденином, «соответствующий аналог нуклеотида» содержит звено пентозы (отличное от 2-дезоксирибозы), связанное с аденином. Примеры азотистых оснований включают, но не ограничиваются ими, аденин, гуанин, цитозин, тимидин, урацил, ксантин, гипоксантин, 5-метилцитозин, изоцитозин, псевдоизоцитозин, 5-бромурацил, 5-пропинилурацил, 6-аминопурин, 2-аминопурин, инозин, диаминопурин и 2-хлор-6-аминопурин. В некоторых аспектах, азотистые основания могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из аденина, гуанина, цитозина, тимидина, урацила, 5-метилцитозина. В некоторых аспектах, азотистые основания могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из аденина, гуанина, цитозина, тимидина и 5-метилцитозина. В некоторых аспектах, по меньшей мере одно из азотистых оснований, присутствующих в олигомере по настоящему изобретению, представляет собой модифицированное азотистое основание, выбранное из группы, состоящей из 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоизоцитозина, 5-бромурацила, 5-пропинилурацила, 6-аминопурина, 2-аминопурина, инозина, диаминопурина и 2-хлор-6-аминопурина.

**[98]** «Аналоги нуклеотидов» представляют собой варианты природных нуклеотидов, таких как нуклеотиды ДНК или РНК, за счет модификаций сахаров и/или оснований. Аналоги в принципе могут быть просто «сайлент» или «эквивалентными» природным нуклеотидам в контексте олигонуклеотида, т. е. не оказывать функционального влияния на то, как олигонуклеотид работает для ингибирования экспрессии целевого гена. Такие «эквивалентные» аналоги тем не менее могут быть полезны, если, например, они проще или дешевле в производстве, или более устойчивы к условиям хранения или изготовления, или представляют собой бирку или метку.

**[99]** Используемый в настоящем документе термин «PCSK9» относится к пропротеинконвертазе субтилизин/кексин типа 9, которая представляет собой фермент, кодируемый геном PCSK9 у людей на хромосоме 1. Ген PCSK9 находится на хромосоме 1 в полосе 1p32.3. Это 9-й член семейства белков пропротеинконвертазы, которые активируют другие белки. Сходные гены (ортологи) встречаются у многих видов. Установленная структура PCSK9 показывает четыре основных компонента в предварительно обработанном белке: сигнальный пептид (остатки 1-30); N-концевой продомен (остатки 31-152); каталитический домен (остатки 153-425); и C-концевой домен (остатки 426-692), который далее делится на три модуля. N-концевой продомен имеет гибкую кристаллическую структуру и отвечает за регуляцию функции PCSK9, взаимодействуя и блокируя каталитический домен, который в противном случае связывает эпидермальный фактор роста-подобный повтор А (EGF-A) домен LDLR. В то

время как предыдущие исследования показали, что С-концевой домен не участвует в связывании LDLR, недавние исследования показали, что С-концевой домен действительно связывает LDLR. Секреция PCSK9 в значительной степени зависит от ауторасщепления сигнального пептида и N-концевого продомена, хотя N-концевой продомен сохраняет свою связь с каталитическим доменом. В частности, остатки 61-70 в N-концевом продоме имеют решающее значение для его автопроцессинга.

**[100]** Термин «его встречающийся в природе вариант» относится к вариантам полипептида PCSK9 с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая существует в природе в пределах определенной таксономической группы, такой как млекопитающие, такие как мышь, обезьяна и предпочтительно человек. Как правило, когда речь идет о «природных вариантах» полинуклеотида, этот термин также может охватывать любой аллельный вариант геномной ДНК, кодирующей PCSK9, который обнаруживается на хромосоме 4, на 4 С7 путем хромосомной транслокации или дупликации, и РНК, такой как мРНК, полученная из них. «Природные варианты» также могут включать варианты, полученные в результате альтернативного сплайсинга мРНК PCSK9. Когда речь идет, например, о конкретной полипептидной последовательности, этот термин также включает встречающиеся в природе формы белка, которые, таким образом, могут подвергаться процессингу, например, ко- или посттрансляционными модификациями, например, расщепление сигнального пептида, протеолитическое расщепление или гликозилирование.

**[101]** Используемый в настоящем документе термин «2'-F» относится к сахару, содержащему фторгруппу во 2'-положении.

**[102]** Используемый в настоящем документе термин «2'-ОМе», или «2'-ОСН<sub>3</sub>», или «2'-О-метил» относится к нуклеозиду, содержащему сахар, содержащий группу -ОСН<sub>3</sub> в 2'-положении сахарного кольца.

**[103]** Термин «длина нуклеотида», используемый в настоящем документе, означает общее количество нуклеотидов (мономеров) в данной последовательности. Как понятно специалисту в данной области техники, 5'-концевой нуклеотид олигонуклеотида не содержит 5'-концевую группу межнуклеозидной связи, хотя он может содержать 5'-концевую группу.

**[104]** Соединения, описанные в настоящем документе, могут содержать несколько центров асимметрии и могут присутствовать в форме оптически чистых энантиомеров, смесей энантиомеров, таких как, например, рацематы, смеси диастереоизомеров, диастереоизомерные рацематы или смеси диастереоизомерных рацематов. В некоторых

аспектах, асимметрический центр может представлять собой асимметрический атом углерода. Термин «асимметрический атом углерода» означает атом углерода с четырьмя различными заместителями. Согласно Конвенции Кана-Ингольда-Прелога асимметричный атом углерода может иметь конфигурацию «R» или «S».

**[105]** Используемый в настоящем документе термин «бициклический сахар» относится к модифицированному фрагменту сахара, содержащему 4-7-членное кольцо, содержащее мостик, соединяющий два атома 4-7-членного кольца с образованием второго кольца, что приводит к бициклической структуре. В некоторых аспектах, мостик соединяет C2' и C4' рибозно-сахарного кольца нуклеозида (т.е. мостик 2'-4'), как это наблюдается в нуклеозидах LNA.

**[106]** Используемые в настоящем документе термины «кодирующая область», «кодирующая последовательность» или «открытая рамка считывания» представляют собой часть полинуклеотида, которая состоит из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Хотя «стоп-кодон» (TAG, TGA или TAA) обычно не транслируется в аминокислоту, его можно рассматривать как часть кодирующей области, но любые фланкирующие последовательности, например, промоторы, сайты связывания рибосом, терминаторы транскрипции, интроны, нетранслируемые области ("UTR") и т.п. не являются частью кодирующей области. Границы кодирующей области обычно определяются стартовым кодоном на 5'-конце, кодирующим аминоконец полученного полипептида, и стоп-кодом трансляции на 3'-конце, кодирующим карбоксильный конец полученного полипептида. В некоторых аспектах, олигомер (например, антисмысловый олигомер, ACO) или конъюгат антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008), раскрытые в настоящем документе, могут нацеливаться на кодирующую PCSK9 область нуклеиновой кислоты, кодирующей белок PCSK9, например, РНК.

**[107]** Термин «некодирующая область», используемый в настоящем документе, означает нуклеотидную последовательность, которая не является кодирующей областью. Примеры некодирующих областей включают, но не ограничиваются ими, промоторы, сайты связывания рибосом, терминаторы транскрипции, интроны, нетранслируемые области ("UTR"), некодирующие экзоны и т.п. Некоторые из экзонов могут быть полностью или частью 5'-нетранслируемой области (5'-UTR) или 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) каждого транскрипта. Нетранслируемые области важны для эффективной трансляции транскрипта и для контроля скорости трансляции и периода полужизни транскрипта. В некоторых аспектах, олигомер (например, антисмысловый олигомер, ACO) или конъюгат антисмысловых олигонуклеотидов (например, CIVI 008), раскрытые в настоящем

документе, могут нацеливаться на некодирующую PCSK9 область нуклеиновой кислоты, кодирующей белок PCSK9, например, РНК.

**[108]** Термин «область» при использовании в контексте нуклеотидной последовательности относится к части этой последовательности. Например, фраза «область в пределах нуклеотидной последовательности» или «область в пределах комплементарной последовательности нуклеотидов» относится к последовательности короче, чем нуклеотидная последовательность, но длиннее, чем по меньшей мере 10 нуклеотидов, расположенных в пределах конкретной нуклеотидной последовательности или комплементарной последовательности нуклеотидов, соответственно. Термин «подпоследовательность» или «подпоследовательность» может также относиться к области нуклеотидной последовательности.

**[109]** Термин «нижележащий», когда он относится к нуклеотидной последовательности, означает, что нуклеиновая кислота или нуклеотидная последовательность расположены 3' относительно эталонной нуклеотидной последовательности. В некоторых аспектах, нижележащие нуклеотидные последовательности относятся к последовательностям, которые следуют за начальной точкой транскрипции. Например, кодон инициации трансляции гена расположен ниже сайта начала транскрипции. В некоторых аспектах, олигомер (например, антисмысловый олигомер, АСО) или конъюгат антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008), раскрытые в настоящем документе, могут нацеливаться на область нуклеиновой кислоты, кодирующую белок PCSK9, например, РНК, расположенную ниже открытой рамки считывания (ОРС) PCSK9.

**[110]** Термин «вышележащий» относится к нуклеотидной последовательности, которая расположена на 5' относительно эталонной нуклеотидной последовательности. В некоторых аспектах, олигомер (например, антисмысловый олигомер, АСО) или конъюгат антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008), раскрытые в настоящем документе, могут нацеливаться на область нуклеиновой кислоты, кодирующую белок PCSK9, например, РНК, расположенную выше ОРС PCSK9.

**[111]** Используемый в настоящем документе термин «регуляторная область» относится к нуклеотидным последовательностям, расположенным выше (5'-некодирующие последовательности), внутри или ниже (3'-некодирующие последовательности) кодирующей области и которые влияют на транскрипцию, процессинг РНК, стабильность или трансляцию соответствующей кодирующей области. Регуляторные области могут включать промоторы, лидерные последовательности трансляции, интроны, последовательности распознавания полиаденилирования, сайты процессинга РНК, сайты

связывания эффекторов, UTR и структуры «стебель-петля». Если кодирующая область предназначена для экспрессии в эукариотической клетке, сигнал полиаденилирования и последовательность терминации транскрипции обычно располагаются на 3'-конце кодирующей последовательности. В некоторых аспектах, олигомер (например, антисмысловый олигомер, АСО) или конъюгат антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008), раскрытые в настоящем документе, могут нацеливаться на регуляторную область.

**[112]** Термин «транскрипт», используемый в настоящем документе, может относиться к первичному транскрипту, который синтезируется путем транскрипции ДНК и после процессинга становится матричной РНК (мРНК), т.е. предшественником матричной РНК (пре-мРНК), и процессированной сама мРНК. Термин «транскрипт» можно использовать взаимозаменяемо с терминами «пре-мРНК» и «мРНК». После того, как нити ДНК транскрибируются в первичные транскрипты, вновь синтезированные первичные транскрипты модифицируются несколькими способами для превращения в их зрелые функциональные формы с образованием различных белков и РНК, таких как мРНК, тРНК, рРНК, днРНК, микроРНК и другие. Таким образом, термин «транскрипт» может включать экзоны, интроны, 5'-UTR и 3'-UTR.

**[113]** Используемый в настоящем документе термин «экспрессия» относится к процессу, посредством которого полинуклеотид продуцирует генный продукт, например, РНК или полипептид. Он включает, без ограничения, транскрипцию полинуклеотида в информационную РНК (мРНК) и трансляцию мРНК в полипептид. Экспрессия производит «генный продукт». В данном контексте продукт гена может представлять собой либо нуклеиновую кислоту, например, матричную РНК, полученную путем транскрипции гена, либо полипептид, который транслируется с транскрипта. Генные продукты, описанные в настоящем документе, дополнительно включают нуклеиновые кислоты с посттранскрипционными модификациями, например, полиаденилированием или сплайсингом, или полипептиды с посттрансляционными модификациями, например, метилированием, гликозилированием, добавлением липидов, ассоциацией с другими белковыми субъединицами или протеолитическим расщеплением.

**[114]** Термины «идентичный» или процент «идентичности» в контексте двух или более нуклеиновых кислот относятся к двум или более последовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми при сравнении и выровнены (с введением гэпов, если необходимо) для максимального соответствия, без учета каких-либо

консервативных аминокислотных замен как части идентичности последовательности. Процент идентичности можно измерить с помощью программного обеспечения или алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуального осмотра. В данной области техники известны различные алгоритмы и программное обеспечение, которые можно использовать для получения выравниваний аминокислотных или нуклеотидных последовательностей.

**[115]** Термин «процентная идентичность последовательности» или «процентная идентичность» между двумя полинуклеотидными или полипептидными последовательностями относится к числу идентичных совпадающих положений, общих для последовательностей в окне сравнения, с учетом добавлений или делеций (т.е. пробелов), которые должны быть введены для оптимального выравнивания двух последовательностей. Совпадающее положение представляет собой любое положение, в котором идентичный нуклеотид или аминокислота представлены как в целевой, так и в эталонной последовательности. Гэпы, представленные в целевой последовательности, не учитываются, поскольку гэпы не являются нуклеотидами или аминокислотами. Аналогичным образом пробелы, присутствующие в эталонной последовательности, не учитываются, поскольку учитываются нуклеотиды или аминокислоты целевой последовательности, а не нуклеотиды или аминокислоты из эталонной последовательности.

**[116]** Одним из таких неограничивающих примеров алгоритма выравнивания последовательностей является алгоритм, описанный в Karlin *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2264-2268, как модифицировано в Karlin *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:5873-5877, и включено в программы NBLAST и XBLAST (Altschul *et al.*, 1991, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402). В некоторых аспектах, Gapped BLAST может быть использован как описано в Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, 1996, *Methods in Enzymology*, 266:460-480), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) или Megalign (DNASTAR) являются дополнительными общедоступными программами, которые можно использовать для выравнивания последовательностей. В некоторых аспектах, процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями определяют с использованием программы GAP в программном пакете GCG (например, с использованием матрицы NWSgapdna.CMP и веса гэпа, равного 40, 50, 60, 70 или 90, и веса длины из 1, 2, 3, 4, 5 или 6). В некоторых альтернативных аспектах, программа GAP в программном пакете GCG, которая включает в себя алгоритм Нидлемана и Вунша (*J. Mol. Biol.* (48): 444-453 (1970)) может быть

использована для определения процентной идентичности между двумя аминокислотными последовательностями (например, с использованием матрицы BLOSUM 62 или матрицы PAM250, вес гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса длины 1, 2, 3, 4, 5). Альтернативно, в некоторых аспектах, процент идентичности между нуклеотидными или аминокислотными последовательностями определяют с использованием алгоритма Майерса и Миллера (CABIOS, 4:11-17 (1989)). Например, процент идентичности можно определить с помощью программы ALIGN (версия 2.0) и с использованием PAM120 с таблицей остатков, штрафом за длину гэпа, равным 12, и штрафом за гэп, равным 4. Специалист в данной области техники может определить соответствующие параметры для максимального выравнивания с помощью специального программного обеспечения для выравнивания. В некоторых аспектах, используются параметры по умолчанию программного обеспечения для выравнивания.

**[117]** Специалист в данной области поймет, что создание выравнивания последовательностей для расчета процента идентичности последовательностей не ограничивается бинарными сравнениями последовательностей, управляемыми исключительно данными первичной последовательности. Выравнивания последовательностей могут быть получены из множественных выравниваний последовательностей. Одной из подходящих программ для создания множественных выравниваний последовательностей является ClustalW2, доступная на сайте [www.clustal.org](http://www.clustal.org). Другой подходящей программой является MUSCLE, доступная на сайте [www.drive5.com/muscle/](http://www.drive5.com/muscle/). ClustalW2 и MUSCLE доступны в качестве альтернативы, например, от EBI (Европейский институт биоинформатики).

**[118]** Также следует понимать, что выравнивание последовательностей может быть получено путем объединения данных о последовательностях с данными из разнородных источников, такими как структурные данные (например, кристаллографические структуры белков), функциональные данные (например, местонахождение мутаций) или филогенетические данные. Подходящей программой, которая интегрирует разнородные данные для создания множественного выравнивания последовательностей, является T-Coffee, доступная на сайте [www.tcoffee.org](http://www.tcoffee.org) или альтернативно доступная, например, в EBI. Также следует понимать, что окончательное выравнивание, используемое для расчета процентной идентичности последовательности, можно контролировать либо автоматически, либо вручную.

**[119]** В некоторых аспектах, процентная идентичность «X» первой нуклеотидной последовательности второй нуклеотидной последовательности рассчитывается как  $100 \times$

( $Y/Z$ ), где  $Y$  представляет собой количество аминокислотных остатков, оцененных как идентичные совпадения при выравнивании первой и второй последовательностей (в соответствии с визуальной проверкой или конкретной программой выравнивания последовательностей), а  $Z$  представляет собой общее количество остатков во второй последовательности. Если длина первой последовательности больше, чем длина второй последовательности, процент идентичности первой последовательности второй последовательности будет выше, чем процент идентичности второй последовательности первой последовательности.

**[120]** Каждая из различных областей в пределах одной целевой последовательности полинуклеотида, которая выравнивается с эталонной последовательностью полинуклеотида, может иметь свой собственный процент идентичности последовательности. Следует отметить, что процентное значение идентичности последовательности округляется до ближайшей десятой. Например, 80,11, 80,12, 80,13 и 80,14 округляются до 80,1, а 80,15, 80,16, 80,17, 80,18 и 80,19 округляются до 80,2. Также отмечается, что значение длины всегда будет целым числом.

**[121]** При определении степени «комплементарности» между олигомерами по настоящему изобретению (или их областями) и целевой областью, такой как описанные в настоящем документе, степень «комплементарности» (также «гомология» или «идентичность») выражается как процентная идентичность (или процентная гомология) между последовательностью олигомера (или его области) и последовательностью целевой области (или обратной комплементарностью целевой области), которая лучше всего согласуется с ними. Процент рассчитывается путем подсчета количества выровненных оснований, идентичных между двумя последовательностями, деления на общее количество смежных мономеров в олигомере и умножения на 100. При таком сравнении, если существуют пробелы, предпочтительно, чтобы такие промежутки представляют собой просто несоответствия, а не области, в которых количество мономеров внутри промежутка различается между олигомером по настоящему изобретению и целевой областью.

**[122]** Используемые в настоящем документе термины «ингибирование» и «снижение», например, экспрессии транскрипта гена PCSK9 и/или уровня белка PCSK9 или активности PCSK9 относятся к олигомеру (например, антисмысловому олигомеру, АСО) или конъюгату антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008), описанному в настоящем документе, снижает экспрессию транскрипта гена PCSK9 и/или уровень и/или активность белка PCSK9 в клетке, ткани или субъекте.

**[123]** В некоторых аспектах, термины «ингибирование» и «снижение» относятся к полному ингибированию (100% ингибирование или неопределяемый уровень) транскрипта гена PCSK9 или уровня и/или активности белка PCSK9. В других аспектах термины «ингибирующий» и «снижающий» относятся, например, к по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30 %, по меньшей мере около 35 %, по меньшей мере около 40 %, по меньшей мере около 45 %, по меньшей мере около 50 %, по меньшей мере около 55 %, по меньшей мере около 60 %, по меньшей мере около 65 %, по меньшей мере около 70 %, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% ингибированию транскрипта гена PCSK9, и/или экспрессии, и/или активности белка PCSK9 в клетке, ткани или субъекте.

**[124]** Варианты полинуклеотидов могут содержать изменения в кодирующих областях, некодирующих областях или в обоих. В одном аспекте, варианты полинуклеотидов содержат изменения, которые приводят к молчащим заменам, добавлениям или делециям, но не изменяют свойства или активность кодируемого полипептида. В другом аспекте, нуклеотидные варианты получают путем молчащих замен из-за вырожденности генетического кода. В других аспектах, варианты, в которых 5-10, 1-5 или 1-2 аминокислоты замещены, удалены или добавлены в любой комбинации. Варианты полинуклеотидов могут быть получены по разным причинам, например, для оптимизации экспрессии кодонов для конкретного хозяина (замена кодонов в мРНК человека на другие, например, бактериального хозяина, такого как *E. coli*).

**[125]** Встречающиеся в природе варианты называются «аллельными вариантами» и относятся к одной из нескольких альтернативных форм гена, занимающего данный локус на хромосоме организма (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). Эти аллельные варианты могут варьироваться либо на уровне полинуклеотидов, либо на уровне полипептидов, и они включены в настоящее изобретение. Альтернативно, не встречающиеся в природе варианты могут быть получены методами мутагенеза или путем прямого синтеза.

**[126]** Используемый в настоящем документе термин «связанный с» или «конъюгированный с» используется взаимозаменяемо и относится к ковалентной или нековалентной связи, образованной между первым фрагментом и вторым фрагментом, например, олигомером по настоящему изобретению (например, антисмысловой олигонуклеотид) и конъюгированный фрагмент (например, GalNAc).

[127] Термины «индивидуум», «субъект», «хозяин» и «пациент» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к любому субъекту-млекопитающему, для которого желательна диагностика, лечение или терапия, в частности к людям. Композиции и способы, описанные в настоящем документе, применимы как для терапии человека, так и для применения в ветеринарии. В некоторых аспектах, субъект представляет собой млекопитающее, а в других аспектах субъект представляет собой человека. Используемый в настоящем документе термин «млекопитающее» включает всех млекопитающих, включая, без ограничения, человека, домашних животных (например, собак, кошек и т.п.), сельскохозяйственных животных (например, коров, овец, свиней, лошадей и т.п.) и лабораторных животных (например, обезьяны, крысы, мыши, кролики, морские свинки и т.п.).

[128] Термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает эффективность биологической активности активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, являющихся неприемлемо токсичными для субъекта, в которого композиция может быть введена. Такая композиция может быть стерильной. Термин «пероральная фармацевтическая композиция» относится к фармацевтической композиции, которую можно вводить перорально. Пероральное введение – это способ введения, при котором вещество принимается через рот. «Per os», сокращенно П.О. иногда используется как указание для перорального приема лекарств. Многие лекарства принимаются перорально, потому что они должны оказывать системное действие, достигая, например, различных частей тела через кровотоки.

[129] Используемый в настоящем документе термин «средство доставки» относится к соединениям носителям или молекулам носителям, которые применимы для доставки терапевтического средства по настоящему изобретению. Термин «средство для пероральной доставки», используемый в настоящем документе, относится к соединениям носителям или молекулам носителям, которые применимы для пероральной доставки терапевтических средств по настоящему изобретению.

[130] В некоторых аспектах, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят перорально. Термин «пероральный», используемый в настоящем документе, и его грамматические варианты (например, перорально) включает любой вид перорального пути доставки (включая буккальный, сублабиальный и подъязычный пути). Лекарства для перорального введения могут выпускаться в различных формах, включая твердые лекарственные формы (ТЛФ) для перорального применения (например, таблетки

для проглатывания, жевания или растворения в воде или под языком; капсулы и жевательные капсулы, например, с покрытием, которое растворяется в желудке) или кишечник для высвобождения лекарства там; таблетки и капсулы с пролонгированным высвобождением или пролонгированным высвобождением, которые высвобождают лекарство постепенно; порошки или гранулы) и пероральные жидкие лекарственные формы (например, чай, капли, жидкие лекарства, суспензии или сиропы).

**[131]** «Введение», как используется в настоящем документе, означает введение субъекту композиции, например, пероральной фармацевтической композиции, содержащей олигомер (например, антисмысловой олигомер, АСО) или конъюгат антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008), раскрытый в настоящем документе, фармацевтически приемлемым путем, например, перорально. «Эффективное количество», например, пероральной фармацевтической композиции, содержащей олигомер (например, антисмысловой олигомер, АСО) или конъюгат антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008), раскрытый в настоящем документе, представляет собой количество, достаточное для осуществления конкретно указанной цели. «Эффективное количество» может быть определено эмпирически и обычным образом в зависимости от заявленной цели.

**[132]** «Лечить», «лечение» или «терапия», как используется в настоящем документе, относится, например, к снижению тяжести заболевания или состояния; сокращению продолжительности течения болезни; улучшению или устранению одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием или состоянием; оказание благоприятных эффектов субъекту с заболеванием или состоянием без обязательного излечения заболевания или состояния. Термин также включает профилактику или предотвращение заболевания или состояния или его симптомов.

**[133]** «Предотвратить» или «предотвращение», как используется в настоящем документе, относится к уменьшению или уменьшению возникновения или тяжести конкретного исхода. В некоторых аспектах, предотвращение исхода достигается за счет профилактического лечения. В некоторых аспектах, пероральная фармацевтическая композиция, содержащая олигомер (например, антисмысловой олигомер, АСО) или конъюгат антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008), раскрытый в настоящем документе, вводится субъекту профилактически. В некоторых аспектах, субъект подвержен риску развития, например, гиперхолестеринемии или болезни сердца.

## I. Пероральные фармацевтические композиции

[134] Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям для перорального введения, т.е. пероральным фармацевтическим композициям или составам, содержащим антисмысловой олигомер и пероральное средство доставки. В некоторых аспектах, при этом антисмысловой олигомер имеет длину от 16 до 22 последовательных нуклеотидов, при этом последовательность антисмыслового олигомера содержит непрерывную последовательность длиной 16 нуклеотидов, которая на 100% комплементарна последовательности SEQ ID NO: 31, где антисмысловой олигомер представляет собой гэтмер, содержащий по меньшей мере одно звено LNA, и при этом антисмысловой олигомер нацелен на РНК, кодирующую PCSK9. В некоторых аспектах, антисмысловой олигомер может быть конъюгирован с фрагментом, способным нацеливаться на конкретную ткань, например, печень. Таким образом, в некоторых аспектах, настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию для перорального введения, т.е. фармацевтическую композицию или состав для перорального введения, содержащую конъюгат антисмыслового олигонуклеотида и средство для пероральной доставки, при этом конъюгат антисмыслового олигонуклеотида содержит, например, (i) антисмысловой олигомер, состоящий из 16-22 последовательных нуклеотидов, при этом последовательность антисмыслового олигомера содержит непрерывную последовательность длиной 16 нуклеотидов, которая на 100% комплементарна последовательности SEQ ID NO: 31, и при этом антисмысловой олигомер представляет собой гэтмер, содержащий по меньшей мере одно звено LNA и (ii) по меньшей мере один нуклеотидный или полинуклеотидный фрагмент, ковалентно присоединенный к указанному антисмысловому олигомеру непосредственно или через линкер, расположенный между непрерывной последовательностью олигомера и нуклеотидным или полинуклеотидным фрагментом, при этом конъюгат антисмыслового олигонуклеотида нацелен на РНК, кодирующую PCSK9. В некоторых аспектах, олигомер может представлять собой любой олигомер, раскрытый в Разделе II настоящего описания. В некоторых аспектах, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида может представлять собой любой конъюгат олигонуклеотида, раскрытого в Разделе III настоящего изобретения.

[135] В некоторых аспектах, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида представляет собой молекулу, указанную в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19, представленных на **ФИГ. 18А**. В некоторых аспектах, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида представляет собой (GalNAc) 3-аминогексаметилен-5' фосфоротиоил)-2'-O,4'-C-метилен-

Аденосилил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)- 2'- О,4'-С-метилен Аденосилил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)-2'- О,4'-С-метилен Тимидил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)- 2'- дезоксиГуаносилил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)- 2'-дезоксиЦитидинил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)-2'-дезоксиТимидил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)- 2'-дезоксиАденосилил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)- 2'-дезоксиЦитидинил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)-2'-дезоксиАденосилил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)-2'-дезоксиАденосилил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)-2'-дезоксиАденозил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)- 2'-дезоксиАденозил- (3'>5' О,О-фосфоротиоил)-2'-дезоксиЦитидинил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)- 2'-О,4'-С-метилен (5-метил-Цитидинил)-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)- 2' -О,4'-С-метилен (5-метил-Цитидинил)-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)- 2'-О,4'-С-метилен-Аденосилил гексадеканатриевая соль, т.е. CIVI 008. См. также подробную химическую формулу CIVI 008 на **ФИГ. 18В**.

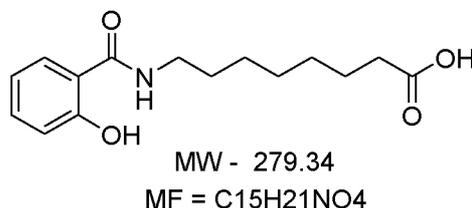
**[136]** В некоторых аспектах, пероральные фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат олигомер или конъюгат олигонуклеотида, раскрытые в настоящем документе (например, CIVI 008), и средство для пероральной доставки, выбранное из группы, состоящей из SNAC, C10, 5-CNAC, гидратов, сольватов или их солей и их комбинаций. В некоторых аспектах, средства для пероральной доставки, применимые в настоящем изобретении, могут включать, например, средства, представляющие собой любую из 123 модифицированных аминокислот, раскрытых, например, в патенте США № 5866536 или любую из 193 модифицированных аминокислот, описанных, например, в патенте США № 5773647 или любую их комбинацию. Содержание вышеупомянутого патента США № 5773647 и 5866536 включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**[137]** В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит одно соединение (например, C8, C10, SNAC или 5-CNAC). В других аспектах средство для пероральной доставки содержит комбинацию соединений (например, любую комбинацию C8, C10, SNAC или 5-CNAC). В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит C8, C10, SNAC, 5-CNAC, 4-CNAB, 4-МОАС, SNAD, 4-НРО (8-(4-гидроксифенокси)октановая кислота), 5-РРА (5- фенилпентановая кислота), 2-РНОD (8-(2-гидроксифенокси)октилдиэтаноламин), 3-ТВА (4-м-толилоксимасляная кислота), 2-НРОD (2-(5-пентановая кислота)-5-(2-гидроксифенил)-1,3,4-оксадиазол), 7-ОРНА (7-оксо-7-фенилгептановая кислота), 3-НПСВ (4-(3-гидроксифенилсульфанил)масляная кислота), 4-ИВОА ((4-изопропилбензилокси)уксусная кислота), 3-ФПСВ (4-(3-

фторфенилсульфанил)масляная кислота) или любую их комбинацию. См., например, **ФИГ. 22.**

**[138]** В некоторых аспектах, SNAC может быть необязательно заменен аналогичным соединением, таким как SNAD (натриевая соль 10-N-(2-гидроксибензоил)аминодекановой кислоты). Структура SNAD отличается от SNAC только длиной фрагмента жирной кислоты. В некоторых аспектах настоящего изобретения, SNAC может быть необязательно заменен аналогичным соединением, при этом каприловая кислота SNAC заменена другой жирной кислотой, имеющей длину не менее 6 атомов углерода, например, от 6 до 20 атомов углерода в длину, необязательно от 6 до 18 атомов углерода в длину, необязательно от 6 до 16 атомов углерода в длину, необязательно от 6 до 14 атомов углерода в длину, необязательно от 6 до 12 атомов углерода в длину и необязательно от 6 до 10 атомов углерода в длину. Часть жирной кислоты может быть насыщенной (например, каприловой кислотой в SNAC и декановой кислотой в SNAD) или ненасыщенной (т.е. содержащей по меньшей мере одну ненасыщенную углерод-углеродную связь).

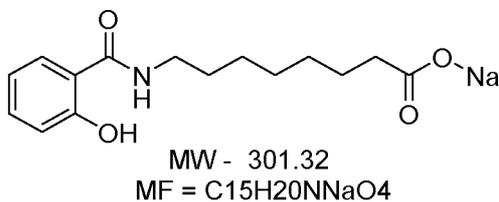
**[139]** В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловую кислоту, как показано ниже.



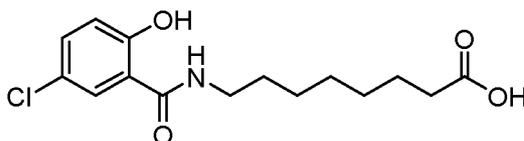
**[140]** В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит соль N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит сольват N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит гидрат N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит соль, гидрат или сольват N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты или любую их комбинацию.

**[141]** В некоторых аспектах, соль N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты выбрана из группы, состоящей из натриевой соли, калиевой соли, кальциевой соли N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты и любой их комбинации. В некоторых аспектах, соль N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты представляет собой натриевую соль. В некоторых аспектах, соль N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты представляет собой динатриевую соль. В некоторых аспектах, соль N-(8-(2-

гидроксibenзоил)амино)каприловой кислоты представляет собой моноватриевую соль (Салькапрозат натрия 203787-91-1, SNAC, 8-(2-гидроксibenзамидо)октаноат натрия), как показано ниже.



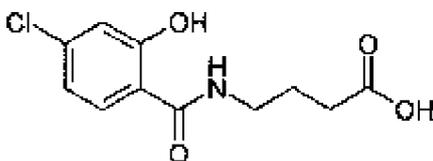
[142] В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит 5-CNAC (N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловую кислоту), как показано ниже.



[143] В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит соль N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит сольват N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит гидрат N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит соль, гидрат или сольват N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты или любую их комбинацию.

[144] В некоторых аспектах, соль N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты выбрана из группы, состоящей из натриевой соли, калиевой соли, кальциевой соли N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты и любой их комбинации. В некоторых аспектах, соль N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты представляет собой натриевую соль. В некоторых аспектах, соль N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты представляет собой динатриевую соль. В некоторых аспектах, соль N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты представляет собой моноватриевую соль.

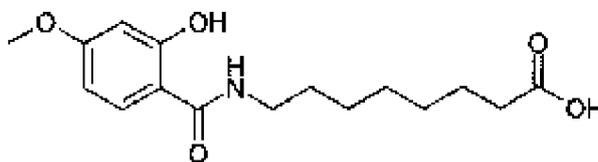
[145] В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит 4-CNAB (4-[(4-хлор-2-гидрокси-бензоил)амино]бутановую кислоту; сальклобузат), как показано ниже.



[146] В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит соль 4-[(4-хлор-2-гидроксибензоил)амино]бутановой кислоты. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит сольват 4-[(4-хлор-2-гидроксибензоил)амино]бутановой кислоты. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит гидрат 4-[(4-хлор-2-гидроксибензоил)амино]бутановой кислоты. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит соль, гидрат или сольват 4-[(4-хлор-2-гидроксибензоил)амино]бутановой кислоты или любую их комбинацию.

[147] В некоторых аспектах, соль 4-[(4-хлор-2-гидроксибензоил)амино]бутановой кислоты выбрана из группы, состоящей из натриевой соли, калиевой соли, кальциевой соли 4-[(4-хлор-2-гидроксибензоил)амино]бутановой кислоты и любой их комбинации. В некоторых аспектах, соль 4-[(4-хлор-2-гидроксибензоил)амино]бутановой кислоты представляет собой натриевую соль. В некоторых аспектах, соль 4-[(4-хлор-2-гидроксибензоил)амино]бутановой кислоты представляет собой динатриевую соль. В некоторых аспектах, соль 4-[(4-хлор-2-гидроксибензоил)амино]бутановой кислоты представляет собой моонатриевую соль.

[148] В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит 4-МОАС (N-(8-[4-метокси-хлор-2-гидроксибензоил]амино)октановую кислоту), как показано ниже.

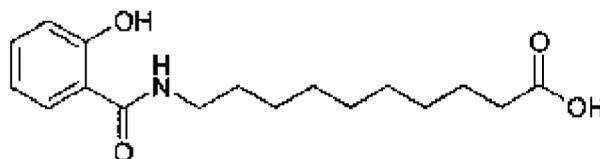


[149] В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит соль N-(8-[4-метокси-хлор-2-гидроксибензоиламино)октановой кислоты. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит сольват N-(8-[4-метокси-хлор-2-гидроксибензоил-амино)октановой кислоты. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит гидрат N-(8-[4-метокси-хлор-2-гидроксибензоиламино)октановой кислоты. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит соль, гидрат или сольват N-(8-[4-метокси-хлор-2-гидроксибензоил]амино)октановой кислоты или любую их комбинацию.

[150] В некоторых аспектах, соль N-(8-[4-метокси-хлор-2-гидроксибензоил-амино)октановой кислоты выбрана из группы, состоящей из натриевой соли, калиевой соли, кальциевой соли N-(8-[4-метокси-хлор-2-гидроксибензоил-амино)октановой кислоты и любой их комбинации. В некоторых аспектах, соль N-(8-[4-метоксихлор-2-гидроксибензоиламино)октановой кислоты представляет собой натриевую соль. В некоторых аспектах, соль N-(8-[4-метокси-хлор-2-гидроксибензоиламино)октановой

кислоты представляет собой динатриевую соль. В некоторых аспектах, соль N-(8-[4-метоксихлор-2-гидроксибензоиламино)октановой кислоты представляет собой моонатриевую соль.

[151] В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит SNAD (N-(10-[2-гидроксибензоил]амино)декановую кислоту), как показано ниже.



[152] В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит соль N-(10-[2-гидроксибензоил]амино)декановой кислоты. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит сольват N-(10-[2-гидроксибензоил]амино)декановой кислоты. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит гидрат N-(10-[2-гидроксибензоил]амино)декановой кислоты. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит соль, гидрат или сольват N-(10-[2-гидроксибензоил]амино)декановой кислоты или любую их комбинацию.

[153] В некоторых аспектах, соль N-(10-[2-гидроксибензоил]амино)декановой кислоты выбрана из группы, состоящей из натриевой соли, калиевой соли, кальциевой соли N-(10-[2-гидроксибензоил]-амино)декановой кислоты и любой их комбинации. В некоторых аспектах, соль N-(10-[2-гидроксибензоил]амино)декановой кислоты представляет собой натриевую соль. В некоторых аспектах, соль N-(10-[2-гидроксибензоил]амино)декановой кислоты представляет собой динатриевую соль. В некоторых аспектах, соль N-(10-[2-гидроксибензоил]амино)декановой кислоты представляет собой моонатриевую соль.

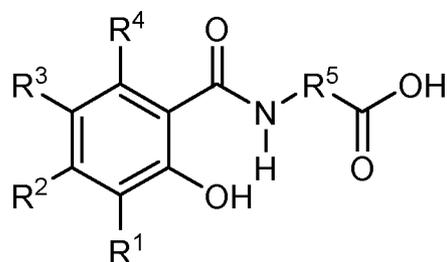
[154] В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит соединение, представленное на ФИГ. 22. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит соль соединения, представленного на ФИГ. 22. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит сольват соединения, представленного на ФИГ. 22. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит гидрат соединения, представленного на ФИГ. 22. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит соль, гидрат или сольват соединения, представленного на ФИГ. 22, или любую их комбинацию.

[155] В некоторых аспектах, соль соединения, представленного на ФИГ. 22, выбрана из группы, состоящей из соли натрия, соли калия, соли кальция соединения, представленного на ФИГ. 22, и любой их комбинации. В некоторых аспектах, соль соединения, представленного на ФИГ. 22 представляет собой натриевую соль. В некоторых аспектах,

соль соединения, представленного на ФИГ. 22, представляет собой динатриевую соль. В некоторых аспектах, соль соединения, представленного на ФИГ. 22, представляет собой моонатриевую соль.

**[156]** См. US5650386A, US6399798B2, US7384982B2, US7659311B2, US8003697B2, US8207227B2, US8658695B2, US7544833B2, US7659311, US8003697, US8207227, US8658695, US7384982, US9278123B2, US10086047B2, US20180360918A1, US20110092426A1, US20150283212A1, US8435946B2, US8748383B2, US7569539B2, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте.

**[157]** В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит соединение формулы, представленной ниже.



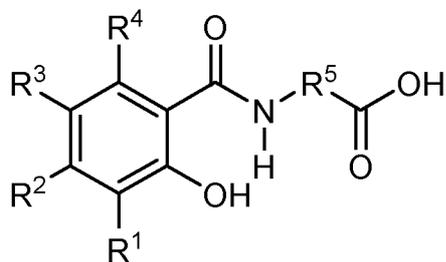
где

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  и  $R^4$  представляют собой независимо водород,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NR}^6\text{R}^7$ , галоген,  $\text{C}_1\text{-C}_4$  алкил или  $\text{C}_1\text{-C}_4$  алкокси;

$R^5$  представляет собой замещенный или незамещенный  $\text{C}_2\text{-C}_{16}$  алкилен, замещенный или незамещенный  $\text{C}_2\text{-C}_{16}$  алкенилен, замещенный или незамещенный  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$  алкил(арил) или замещенный или незамещенный арил( $\text{C}_1\text{-C}_4$  алкилен); и

$R^6$  и  $R^7$  представляют собой независимо водород, кислород или  $\text{C}_1\text{-C}_4$  алкил.

**[158]** В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит соединение



формулы

как описано выше, где соединение

представляет собой свободную кислоту или натриевую соль, например моонатриевую или динатриевую соль. В некоторых аспектах, соединение представляет собой гидрат или сольват. В некоторых аспектах, соединение представляет собой сольват спирта. В некоторых аспектах, сольват спирта представляет собой сольват этанола. В некоторых аспектах, сольват этанола представляет собой сольват соли. В некоторых аспектах,

этанольный сольват представляет собой этанольный сольват моновалентной соли. В некоторых аспектах, сольват этанола представляет собой сольват дивалентной соли этанола. В некоторых аспектах, соединение представляет собой гидрат. В некоторых аспектах, гидрат представляет собой гидрат соли. В некоторых аспектах, гидрат представляет собой гидрат моновалентной соли. В некоторых аспектах, гидрат представляет собой гидрат дивалентной соли.

**[159]** В некоторых аспектах, средства для пероральной доставки, применимые в настоящем изобретении, могут включать жирные кислоты со средней длиной цепи (MCFA), такие как C8 (каприловая кислота), C10 (каприновая кислота) или C12 (лауриновая кислота), их производные, их фармацевтически приемлемую соль, гидрат или сольват или любую их комбинацию.



**[160]** В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит сольват солей C8, C10, SNAC или 5-CNAC. Используемый в настоящем документе термин «сольват» включает, но не ограничивается этим, молекулярный или ионный комплекс молекул или ионов растворителя с молекулами или ионами соединения средства доставки или его соли, или его гидрата, или сольвата.

**[161]** В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит гидрат солей C8, C10, SNAC или 5-CNAC. Используемый в настоящем документе термин «гидрат» включает, но не ограничивается этим, (i) вещество, содержащее воду, объединенную в молекулярной форме, и (ii) кристаллическое вещество, содержащее одну или несколько молекул кристаллизационной воды, или кристаллический материал, содержащий свободную воду.

**[162]** В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит сольват соли C8, C10, SNAC или 5-CNAC, где соль представляет собой соль натрия, соль калия, соль кальция или их комбинацию. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки

содержит сольват соли C8, C10, SNAC или 5-CNAC, где соль представляет собой натриевую соль.

**[163]** В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит сольват соли C8, C10, SNAC или 5-CAN, где соль представляет собой моонатриевую соль. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит натриевую соль C8, например, моонатрия капрат. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит натриевую соль C10, например, моонатрия каприлат. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит натриевую соль SNAC, например, моонатриевую соль SNAC. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит натриевую соль 5-CNAC, например, моонатриевую соль 5-CNAC.

**[164]** В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит спиртовой сольват соли C8, C10, SNAC или 5-CNAC, где соль представляет собой натриевую соль. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит спиртовой сольват солей C8, C10, SNAC или 5-CNAC, где соль представляет собой моонатриевую соль. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит гидрат соли C8, C10, SNAC или 5-CNAC, где соль представляет собой натриевую соль. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит гидрат соли C8, C10, SNAC или 5-CNAC, где соль представляет собой моонатриевую соль. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки содержит гидрат соли C8, C10, SNAC или 5-CNAC, где соль представляет собой натриевую соль, а гидрат представляет собой моногидрат.

**[165]** Способы получения солей натрия, сольватов спиртов и гидратов описаны, например, в международной публикации WO 00/059863, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Например, соль натрия может быть получена из сольвата этанола выпариванием или сушкой сольвата этанола способами, известными в данной области техники, с образованием безводной соли натрия. Сушку обычно проводят при температуре от около 80 °C до около 120 °C, например, от около 85 °C до около 90 °C. В некоторых аспектах, сушку проводят около при 85°C. Стадию сушки обычно проводят при давлении около 660 мм ртутного столба (8,8 кПа) или выше. Безводная натриевая соль обычно содержит менее около 5 мас. % этанола и предпочтительно менее около 2 мас. % этанола в расчете на 100 % общей массы безводной натриевой соли.

**[166]** Натриевая соль средства для пероральной доставки, описанного в настоящем документе, также может быть получена путем приготовления суспензии средства для доставки в воде и добавления водного гидроксида натрия, алкоголята натрия или т.п. Подходящие алкоксиды натрия включают, но не ограничиваются ими, метоксид натрия,

этоксид натрия и их комбинации. Еще одним способом получения натриевой соли является взаимодействие средства доставки с гидроксидом натрия с получением натриевой соли.

**[167]** Натриевая соль может быть выделена в виде твердого вещества путем концентрирования раствора, содержащего натриевую соль, до густой пасты путем вакуумной перегонки. Эту пасту можно высушить в вакуумной печи, чтобы получить натриевую соль средства доставки в виде твердого вещества. Твердое вещество можно также выделить распылительной сушкой водного раствора динатриевой соли. Средства для пероральной доставки, раскрытые в настоящем документе, могут быть получены способами, известными в данной области техники, например, как указано выше, способами, описанными в патенте США № 5773647 и 5866536, которые полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

**[168]** Этанольные сольваты молекул средства для пероральной доставки, раскрытые в настоящем документе (например, C8, C10, SNAC, 5-CNAC или любая их комбинация), включают, но не ограничиваются ими, молекулярный или ионный комплекс молекул или ионов этанольного растворителя с молекулами или ионами натриевой соли средства доставки. Обычно сольват этанола содержит около одну молекулу или ион этанола на каждую молекулу натриевой соли средства доставки.

**[169]** Этанольные сольваты натриевых солей средств доставки могут быть получены путем растворения средства доставки в этаноле. Затем раствор средства доставки/этанол вводят в реакцию с молярным избытком натрийсодержащей соли, такой как соль, содержащая мононатрий, по отношению к средству доставки, т. е. на каждый моль средства доставки приходится больше чем один моль катионов натрия, что дает сольват этанола. Подходящие мононатриевые соли включают, но не ограничиваются ими, гидроксид натрия; алкоксиды натрия, такие как метоксид натрия и этоксид натрия; и любую комбинацию вышеперечисленного. Обычно реакцию проводят при температуре кипения смеси или ниже, например, при температуре окружающей среды. Сольват этанола затем извлекают известными способами, такими как концентрирование полученной суспензии при атмосферной перегонке, охлаждение концентрированной суспензии и фильтрацию твердого вещества. Восстановленное твердое вещество затем может быть высушено в вакууме для получения сольвата с этанолом.

**[170]** Гидраты натриевых солей средств доставки могут быть получены путем высушивания сольвата этанола до безводной динатриевой соли, как описано выше, и гидратации безводной натриевой соли. В некоторых аспектах, образуется моногидрат

натриевой соли. Поскольку безводные соли натрия очень гигроскопичны, при воздействии атмосферной влаги образуются гидраты. Как правило, стадию гидратации проводят при температуре от около комнатной до около 50 °С, предпочтительно от температуры окружающей среды до около 30 °С, и в окружающей среде с относительной влажностью не менее 50 %. В качестве альтернативы безводная натриевая соль может быть гидратирована водяным паром.

[171] Пероральные фармацевтические композиции по настоящему изобретению обычно содержат эффективное количество одного или нескольких средств доставки (например, C8, C10, SNAC, 5-CNAC или любую их комбинацию), раскрытых в настоящем документе, т.е. количество, достаточное для доставки активного агента (например, CIVI 008) для желаемого эффекта. Как правило, средство для пероральной доставки (например, C8, C10, SNAC, 5-CNAC или любая их комбинация) присутствует в количестве от около 2,5 % до около 99,4 % по массе. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки (например, C8, C10, SNAC, 5-CNAC или любая их комбинация) присутствует в количестве от около 15% до около 75% по массе. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки (например, C8, C10, SNAC, 5-CNAC или любая их комбинация) присутствует в количестве по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30% или по меньшей мере около 35%, но равно или меньше около 60 или около 70% по массе. Соответственно, в некоторых аспектах, средство для пероральной доставки (например, C8, C10, SNAC, 5-CNAC или любая их комбинация) присутствует в количестве по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65% или по меньшей мере около 70% по массе. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки (например, C8, C10, SNAC, 5-CNAC или любая их комбинация) присутствует в количестве около 25%, около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65% или около 70% по массе.

[172] В некоторых аспектах, пероральную фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят в виде однократной дозы. Термин «однократная доза» означает, что фармацевтическая композиция для перорального введения согласно изобретению, содержащая олигомер или конъюгат олигонуклеотида, раскрытый в настоящем документе (например, CIVI 008), и средство для пероральной доставки, выбранные из группы, состоящей из SNAC, C10 или 5-CNAC, их гидратов, сольватов или

солей и их комбинации, например, в форме пероральной стандартной дозы, вводят человеку или животному в виде одной дозы.

[173] В некоторых аспектах, пероральную фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят в виде нескольких доз. Термин «многократная доза» означает, что фармацевтическая композиция для перорального введения согласно изобретению, содержащая олигомер или конъюгат олигонуклеотида, раскрытый в настоящем документе (например, CIVI 008), и средство для пероральной доставки, выбранное из группы, состоящей из SNAC, C10 или 5-CNAC, их гидратов, сольватов или солей и их комбинации, например, в форме пероральной стандартной дозы, вводят пациенту человеку или животному по меньшей мере двумя дозами в соответствии с интервалом дозирования, подходящим для этой композиции.

[174] Используемый в настоящем документе термин «пероральная стандартная дозированная форма» относится к физически дискретным единицам, подходящим для потребления человеком и животными и упакованным индивидуально, как известно в данной области техники. Для целей настоящего изобретения предполагается, что лекарственные формы, содержащие терапевтически эффективные количества олигомера или конъюгата олигонуклеотида, раскрытого в настоящем документе (например, CIVI 008), и средство для пероральной доставки, могут включать одну или несколько стандартных доз (например, таблетки, капсулы) для достижения терапевтического эффекта.

[175] Пероральные лекарственные формы (например, таблетки или капсулы) пероральных фармацевтических композиций по настоящему изобретению (например, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, такой как CIVI 008, в комбинации с пероральным средством доставки, таким как SNAC, C10 или 5-CNAC) можно вводить за около 5-60 минут до еды. Пероральные лекарственные формы пероральных фармацевтических композиций по настоящему изобретению (например, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, такой как CIVI 008, в комбинации с пероральным средством доставки, таким как SNAC, C10 или 5-CNAC) можно вводить от около 30 минут до около 60 минут до еды. Можно вводить пероральные лекарственные формы (например, таблетки или капсулы) пероральных фармацевтических композиций по настоящему изобретению (например, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, такой как CIVI 008, в комбинации с пероральным средством доставки, таким как SNAC, C10 или 5-CNAC) от около 45 минут до около 90 минут до еды. Пероральные лекарственные формы (например, таблетки или капсулы) пероральных фармацевтических композиций по

настоящему изобретению (например, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, такой как CIVI 008, в комбинации с пероральным средством доставки, таким как SNAC, C10 или 5-CNAC) можно вводить от за около 60 минут (1 час) до около 120 минут (2 часа) до еды.

**[176]** В некоторых аспектах, пероральную фармацевтическую композицию по настоящему изобретению (например, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, такой как CIVI 008, в комбинации с пероральным средством доставки, таким как SNAC, C10 или 5-CNAC) можно вводить по меньшей мере за около 5, по меньшей мере за около 10, по меньшей мере за около 15, по меньшей мере за около 20, по меньшей мере за около 25, по меньшей мере за около 30, по меньшей мере за около 35, по меньшей мере за около 40, по меньшей мере за около 45, по меньшей мере за около 50, по меньшей мере за около 55, по меньшей мере за около 60, по меньшей мере за около 65, по меньшей мере за около 70, по меньшей мере за около 75, по меньшей мере за около 80, по меньшей мере за около 85, по меньшей мере за около 90, по меньшей мере за около 95, по меньшей мере за около 100, по меньшей мере за около 105, по меньшей мере за около 110, по меньшей мере за около 115 или по меньшей мере за около 120 минут до еды.

**[177]** В некоторых аспектах, пероральную фармацевтическую композицию по настоящему изобретению (например, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, такой как CIVI 008, в комбинации с пероральным средством доставки, таким как SNAC, C10 или 5-CNAC) вводят за около 5, за около 10, за около 15, за около 20, за около 25, за около 30, за около 35, за около 40, за около 45, за около 50, за около 55, за около 60, за около 65, за около 70, за около 75, за около 80, за около 85, за около 90, за около 95, за около 100, за около 105, за около 110, за около 115 или за около 120 минут до еды.

**[178]** В некоторых аспектах, пероральную фармацевтическую композицию по настоящему изобретению (например, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, такой как CIVI 008, в комбинации со средством для пероральной доставки, таким как SNAC, C10 или 5-CNAC) вводят по меньшей мере за около 30 минут до еды. В некоторых аспектах, пероральную фармацевтическую композицию по настоящему изобретению (например, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, такой как CIVI 008, в комбинации с пероральным средством доставки, таким как SNAC, C10 или 5-CNAC) вводят по меньшей мере за около 45 минут до еды. В некоторых аспектах, пероральную фармацевтическую композицию по настоящему изобретению (например, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, такой как CIVI 008, в комбинации с пероральным средством доставки, таким как SNAC, C10 или 5-CNAC) вводят по меньшей мере за около 60 минут до еды. В некоторых аспектах, пероральную фармацевтическую композицию по

настоящему изобретению (например, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, такой как CIVI 008, в комбинации с пероральным средством доставки, таким как SNAC, C10 или 5-CNAC) вводят по меньшей мере за около 2 часа до еды.

**[179]** Пероральные фармацевтические композиции по настоящему изобретению (например, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, такой как CIVI 008, в комбинации с пероральным средством доставки, таким как SNAC, C10 или 5-CNAC) могут быть предоставлены в твердой форме. В некоторых аспектах, твердая форма представляет собой капсулу, например, капсулу с мягким гелем или капсулу, наполненную жидкостью (капсула с жидкостью). Фармацевтические композиции для перорального применения по настоящему изобретению также могут быть представлены в виде таблеток, каплет или других твердых лекарственных форм для перорального применения, причем все они могут быть получены способами, хорошо известными в данной области.

**[180]** В некоторых аспектах, пероральная лекарственная форма (например, таблетка или капсула) может иметь массу от около 5 мг до около 1000 мг, от около 10 мг до около 500 мг, от около 10 мг до около 250 мг, от около 100 мг до около 200 мг или от около 250 мг до около 500 мг. В некоторых аспектах, масса пероральной лекарственной формы (например, таблетки или капсулы) составляет около 5 мг, около 10 мг, около 20 мг, около 25 мг, около 50 мг, около 100 мг, около 200 мг, около 250 мг, около 375 мг, около 500 мг, около 750 мг или около 1000 мг.

**[181]** В некоторых аспектах, количество антисмыслового олигомера или конъюгата антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008) в пероральной лекарственной форме (например, таблетке или капсуле) находится в диапазоне от около 1 мг до около 100 мг, от около 5 до около 100 мг, от около 10 мг до около 100 мг, от около 20 мг до около 100 мг или от около 20 мг до около 50 мг.

**[182]** В некоторых аспектах настоящего изобретения, CIVI 008 сформирован в форме капсулы, при этом капсула представляет собой желатиновую капсулу с твердой оболочкой. В некоторых аспектах, капсула представляет собой капсулу размера 0 (длина в закрытом состоянии 21,7 мм x внешний диаметр 7,6 мм). В некоторых аспектах, капсула представляет собой капсулу размера 4 (длина в закрытом состоянии 14,3 мм x внешний диаметр 5,05 мм). В некоторых аспектах, капсула содержит от около 5 мг до около 30 мг CIVI 008 (натрия цепадакурсен), например, около 5 мг, около 10 мг, около 15 мг, около 20 мг, около 25 мг или около 30 мг CIVI 008. В некоторых аспектах, капсула содержит около 100 мг или около 200 мг 5-CNAC, например, около 100 мг, около 125 мг, около 150 мг,

около 175 мг или около 200 мг 5-CNAC. В некоторых аспектах, начинку капсулы изготавливают путем сухого смешивания ингредиентов (т.е. сухого CIVI 008 и сухого 5-CNAC). В некоторых аспектах, начинку капсулы изготавливают путем лиофилизации совместно растворенной смеси ингредиентов (т.е. CIVI 008 и 5-CNAC). В некоторых аспектах, капсула содержит около 10 мг CIVI 008 и около 100 мг 5-CNAC. В некоторых аспектах, капсула содержит около 20 мг CIVI 008 и около 200 мг 5-CNAC. В некоторых аспектах, капсула содержит около 5 мг CIVI 008 и около 200 мг 5-CNAC. В некоторых аспектах, капсула содержит около 25 мг CIVI 008 и около 200 мг 5-CNAC. В некоторых аспектах, капсула содержит около 30 мг CIVI 008 и около 200 мг 5-CNAC.

**[183]** В некоторых случаях настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, например, в форме капсулы, содержащей, например, около 10 мг CIVI 008 и около 100 мг 5-CNAC, около 20 мг CIVI 008 и около 200 мг 5-CNAC, около 5 мг CIVI 008 и около 200 мг 5-CNAC, около 25 мг CIVI 008 и около 200 мг 5-CNAC или около 30 мг CIVI 008 и около 200 мг 5-CNAC, при этом введение фармацевтической композиции субъекту приводит к увеличению средней  $AUC_{0-50}$  по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90% или по меньшей мере на около 100% относительно средней  $AUC_{0-50}$ , измеренной при введении субъекту соответствующей фармацевтической композиции, содержащей SNAC вместо 5-CNAC. В конкретном аспекте увеличение средней  $AUC_{0-50}$  по отношению к средней  $AUC_{0-50}$ , измеренной при введении субъекту соответствующей фармацевтической композиции, содержащей SNAC вместо 5-CNAC, составляет около 80%.

**[184]** Термин «соответствующая фармацевтическая композиция, содержащая SNAC вместо 5-CNAC», используемый в настоящем документе, относится к эталонной фармацевтической композиции, которая содержит те же компоненты, что и тестируемые фармацевтические композиции, при этом отличием между эталонной фармацевтической композицией и тестируемой композицией является замена SNAC, присутствующего в эталонной фармацевтической композиции, на 5-CNAC. Например, если тестируемая фармацевтическая композиция находится в капсуле размера 4, содержащей 10 мг CIVI 008 и 100 мг 5-CNAC, соответствующая эталонная фармацевтическая композиция также будет находиться в капсуле размера 4 и будет содержать 10 мг CIVI 008 и 100 мг SNAC.

**[185]** В некоторых аспектах, настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, например, в форме капсулы, содержащую, например, около 10 мг CIVI 008 и

около 100 мг 5-CNAC, около 20 мг CIVI 008 и около 200 мг 5-CNAC, около 5 мг CIVI 008 и около 200 мг 5-CNAC, около 25 мг CIVI 008 и около 200 мг 5-CNAC или около 30 мг CIVI 008 и около 200 мг 5-CNAC, при этом введение фармацевтической композиции субъекту приводит к увеличению средней  $C_{max}$  по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 100%, по меньшей мере на около 110%, по меньшей мере на около 120%, по меньшей мере на около 130%, по меньшей мере на около 140% или по меньшей мере на около 150% по отношению к средней  $C_{max}$ , измеренной при введении субъекту соответствующей фармацевтической композиции, содержащей SNAC вместо 5-CNAC. В конкретном аспекте увеличение средней  $C_{max}$  по отношению к средней  $C_{max}$ , измеренной при введении субъекту соответствующей фармацевтической композиции, содержащей SNAC вместо 5-CNAC, составляет около 110%.

**[186]** В некоторых аспектах, количество антисмыслового олигомера или конъюгата антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008) в пероральной лекарственной форме (например, таблетке или капсуле) составляет около 1, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18, около 19, около 20, около 21, около 22, около 23, около 24, около 25, около 26, около 27, около 28, около 29, около 30, около 31, около 32, около 33, около 34, около 35, около 36, около 37, около 38, около 39, около 40, около 41, около 42, около 43, около 44, около 45, около 46, около 47, около 48, около 49, около 50, около 51, около 52, около 53, около 54, около 55, около 56, около 57, около 58, около 59, около 60, около 61, около 62, около 63, около 64, около 65, около 66, около 67, около 68, около 69, около 70, около 71, около 72, около 73, около 73, около 75, около 76, около 77, около 78, около 79, около 80, около 81, около 82, около 83, около 84, около 85, около 86, около 87, около 88, около 89, около 90, около 91, около 92, около 93, около 94, около 95, около 96, около 97, около 98, около 99 или около 100 мг.

**[187]** В некоторых аспектах, пероральная фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать, в дополнение к конъюгату антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008), раскрытому в настоящем документе, и средству для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC), по меньшей мере один фармацевтически приемлемый наполнитель или их комбинацию. В некоторых аспектах, по меньшей мере один фармацевтически приемлемый наполнитель или их комбинация,

например, в обычно используемых количествах, выбраны из группы, состоящей, помимо прочего, из регулятора уровня pH, консерванта, ароматизатора, агента, маскирующего вкус, ароматизатора, увлажнителя, тонизирующего агента, красителя, поверхностно-активного вещества, пластификатора, смазывающего вещества, такое как стеарат магния, средства для повышения текучести, средства для сжатия, солюбилизатора, наполнителя, разбавителя, такого как микрокристаллическая целлюлоза (например, Avicel PH 102) или любую их комбинации. В некоторых аспектах, пероральная фармацевтическая композиция по настоящему изобретению (например, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, такой как CIVI 008, в комбинации с пероральным средством доставки, таким как SNAC, C10 или 5-CNAC) содержит микрокристаллическую целлюлозу. В некоторых аспектах, пероральная фармацевтическая композиция по настоящему изобретению (например, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, такой как CIVI 008, в комбинации с пероральным средством доставки, таким как SNAC, C10 или 5-CNAC) содержит соли фосфатного буфера, лимонную кислоту, гликоли, другие диспергирующие агенты или любую их комбинацию.

**[188]** В некоторых аспектах, пероральная фармацевтическая композиция по настоящему изобретению (например, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, такой как CIVI 008, в комбинации со средством для пероральной доставки, таким как SNAC, C10 или 5-CNAC) может включать разбавитель, например, такой как микрокристаллическая целлюлоза (например, авицел) и смазывающее вещество, например, стеарат магния. В некоторых аспектах, пероральная фармацевтическая композиция по настоящему изобретению (например, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, такой как CIVI 008, в комбинации с пероральным средством доставки, таким как SNAC, C10 или 5-CNAC) может содержать повидон и/или кросповидон. Кросповидон может представлять собой любой кросповидон. Кросповидон представляет собой синтетический сшитый гомополимер N-винил-2-пирролидона, также называемый 1-этинил-2-пирролидоном, с молекулярной массой 1000000 или более. Коммерчески доступные кросповидоны включают Polyplasdone XL, Polyplasdone XL-10, Polyplasdone INF-10, доступные от ISP, Kollidon CL, доступный от BASF Corporation. В некоторых аспектах, кросповидон представляет собой Polyplasdone XL. Повидон представляет собой синтетический полимер, состоящий из линейных 1-винил-2-пирролидиноновых групп, имеющих молекулярную массу обычно от 2500 до 3000000. Коммерчески доступные повидоны включают Kollidon K-30, Kollidon K-90F, доступные от BASF Corporation, и Plasdone K-30 и Plasdone K-29/32, доступные от ISP. Как упоминалось выше, кросповидоны и повидоны

коммерчески доступны. Альтернативно, они могут быть синтезированы известными способами. Кросповидон, повидон или их комбинация могут присутствовать в фармацевтической композиции для перорального применения по настоящему изобретению в количестве от 0,5 до 50 процентов по массе по отношению к общей массе всей фармацевтической композиции для перорального применения, например, от около 2 до около 25 процентов или от около 5 до около 20 процентов по массе относительно общей массы пероральной фармацевтической композиции.

**[189]** В некоторых аспектах, пероральная лекарственная форма (например, таблетка или капсула), содержащая пероральную фармацевтическую композицию по настоящему изобретению (например, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, такой как CIVI 008, и средство для пероральной доставки, такое как SNAP или C10 и, необязательно, статин) могут содержать покрытие, например, энтеросолюбильное покрытие и/или pH-чувствительное покрытие, и необязательно содержать агенты, ингибирующие ферменты. Соответственно, в некоторых аспектах, твердая пероральная лекарственная форма по существу не распадается или не растворяется в желудке, но по существу распадается или растворяется в кишечнике. В некоторых аспектах, пероральная фармацевтическая композиция по настоящему изобретению (например, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, такой как CIVI 008, и средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC, и необязательно статин) может дополнительно содержать один или несколько агентов, ингибирующих ферменты, которые предотвращают ферментативное расщепление активных агентов в фармацевтическом составе, например, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008) и/или необязательный терапевтический агент, такой как статин, в желудке или верхних отделах кишечника.

**[190]** В некоторых аспектах, пероральная фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению или пероральная лекарственная форма, раскрытая в настоящем документе (например, таблетка или капсула), покрыта энтеросолюбильным покрытием для замедления распада в желудке. Энтеросолюбильные покрытия включают, но не ограничиваются ими, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, сукцинат ацетат гидроксипропилметилцеллюлозы, фталат поливинилацетата, тримеллитат ацетат целлюлозы, фталат ацетат целлюлозы, поли(метакриловая кислота-этилакрилат), поли(метакриловая кислота-метилметакрилат) и их комбинации. В еще одном аспекте пероральные фармацевтические композиции могут быть составлены таким образом, чтобы происходила эрозия поверхности лекарственной формы для перорального введения, а не ее дезинтеграция.

**[191]** В некоторых аспектах, пероральная фармацевтическая композиция по настоящему изобретению или пероральная лекарственная форма, раскрытая в настоящем документе (например, таблетка или капсула), дополнительно содержит рН-чувствительное покрытие, например, рН-чувствительный полимер, который защищает пероральную фармацевтическую композицию или ее пероральную дозированную форму от кислой среды в желудке. В некоторых аспектах, рН-чувствительный полимер содержит целлюлозу, акриловую кислоту или их производное. В некоторых аспектах, рН-чувствительное покрытие включает рН-чувствительный гидрогель, рН-активированную систему доставки лекарств, рН-чувствительные липосомы, мицеллы или липидные наночастицы, рН-чувствительные микросферы, рН-чувствительные наночастицы или любую их комбинацию.

**[192]** Энтеросолюбильные (гастроустойчивые) покрытия, рН-чувствительные покрытия, агент, ингибирующий ферменты, и составы на основе желатина, используемые, например, в жидких или гелевых капсулах, более подробно описаны ниже.

**[193]** В некоторых аспектах, фармацевтические композиции для перорального введения по настоящему изобретению могут содержать в дополнение к конъюгату антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008), раскрытому в настоящем документе, и средству для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC), второе терапевтически активное соединение (терапевтическое средство), выбранное из группы, состоящей из статина (например, ловастатин, церивастатин, правастатин, аторвастатин, симвастатин, розувастатин, флувастатин или их комбинации), эзетимиба, смолы, связывающей желчь, никотиновой кислоты, производного фибриновой кислоты, пробукола, неомицина, декстротироксина, растительного станолевого эфира, ингибитора абсорбции холестерина, имплитапида, ингибитора переносчиков желчных кислот, регулятора печеночного CYP7a, заместительного эстрогенного терапевтического средства, противовоспалительного средства. Как правило, фармацевтические композиции для перорального введения по настоящему изобретению могут содержать в дополнение к конъюгату антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008), раскрытому в настоящем документе, и средству для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC), второе терапевтически активное соединение, используемое в данной области для лечения заболевания или состояния, связанного с увеличением экспрессии PCSK9 и/или активности PCSK9.

**[194]** В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способу снижения уровней экспрессии и/или активности PCSK9 в клетке *in vitro*, включающему введение эффективного количества пероральной фармацевтической композиции по настоящему

изобретению, содержащей, например, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида. (например, CIVI 008), раскрытое в настоящем документе, средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC) и необязательно второе терапевтическое средство, такое как статин.

**[195]** В настоящем изобретении также предложен способ снижения уровней экспрессии PCSK9 и/или уровней активности PCSK9 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции пероральной фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включающей, например, антисмысловой олигонуклеотидный конъюгат (например, CIVI 008), описанный в настоящем документе, средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC) и необязательно второе терапевтическое средство, такое как статин. Также предложен способ снижения уровня холестерина у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту эффективного количества пероральной фармацевтической композиции по настоящему изобретению, содержащей, например, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида (например, CIVI 008), раскрытый в настоящем документе, средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC) и необязательно второе терапевтическое средство, такое как статин.

**[196]** Фармацевтические композиции для перорального применения по настоящему изобретению могут быть получены обычными способами, т.е. путем смешивания смеси активного агента или активных агентов, средства для пероральной доставки и других ингредиентов, замешивания и заполнения капсул или, вместо заполнения капсул, формования с последующим таблетированием или прессованием с получением таблеток. Кроме того, твердая дисперсия может быть получена известными способами с последующей дальнейшей обработкой для получения таблетки или капсулы. В некоторых аспектах, ингредиенты пероральных фармацевтических композиций по настоящему изобретению гомогенно или однородно перемешаны во всей твердой лекарственной форме.

**[197]** Термин «капсула», используемый в настоящем документе, предназначен для обозначения фармацевтического препарата, содержащего твердую или мягкую оболочку (например, желатиновую оболочку), обычно содержащую одну дозу активного вещества (например, CIVI 008). В одном аспекте капсула предназначена для перорального введения. В некоторых аспектах, оболочка капсулы (также известная как корпус капсулы) будет разрушаться в желудке после приема внутрь (например, при проглатывании) с

высвобождением содержимого капсулы (например, сухой смеси, описанной в настоящем документе, содержащей, например, CIVI 008 и 5-CNAC).

**[198]** Используемый в настоящем документе термин «сухое смешивание» означает тщательное смешивание нескольких компонентов вместе (например, CIVI 800 и 5-CNAC) в отсутствие жидкой среды. В некоторых аспектах, компонент сухой смеси (например, CIVI 800, 5-CNAC или оба) может быть в форме порошка. В некоторых аспектах, компонент сухой смеси (например, CIVI 800 и 5-CNAC) может быть в форме частиц, например, гранулированным.

**[199]** В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей 10 мг CIVI 008 (цепадакурсена) и 100 мг 5-CNAC, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси. В некоторых аспектах, настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую 20 мг CIVI 008 (цепадакурсен) и 200 мг 5-CNAC, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей 5 мг CIVI 008 (цепадакурсен) и 200 мг 5-CNAC, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей 10 мг CIVI 008 (цепадакурсен) и 200 мг 5-CNAC, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей 25 мг CIVI 008 (цепадакурсен) и 200 мг 5-CNAC, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси. В некоторых аспектах, настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую 30 мг CIVI 008 (цепадакурсен) и 200 мг 5-CNAC, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси.

**[200]** В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к капсуле (например, твердой желатиновой капсуле с энтеросолюбильным покрытием), содержащей 10 мг CIVI 008 (цепадакурсен) и 100 мг 5-CNAC, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к капсуле, содержащей 20 мг CIVI 008 (цепадакурсен) и 200 мг 5-CNAC, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к капсуле, содержащей 5 мг CIVI 008 (цепадакурсен) и 200 мг 5-CNAC, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к капсуле, содержащей 10 мг CIVI 008 (цепадакурсен) и 200 мг 5-CNAC, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси. В некоторых аспектах, настоящее

изобретение относится к капсуле, содержащей 25 мг CIVI 008 (цепадакурсен) и 200 мг 5-CNAC, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к капсуле, содержащей 30 мг CIVI 008 (цепадакурсен) и 200 мг 5-CNAC, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси.

**[201]** В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, вызванного высокими уровнями экспрессии и/или активности PCSK9, у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей 10 мг CIVI 008 (цепадакурсен) и 100 мг 5-CNAC, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси и, необязательно, компоненты находятся в капсуле (например, в твердой желатиновой капсуле с энтеросолюбильным покрытием). В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, вызванного высокими уровнями экспрессии и/или активности PCSK9, у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей 20 мг CIVI 008 (цепадакурсен) и 200 мг 5-CNAC, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси и, необязательно, компоненты находятся в капсуле. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, вызванного высокими уровнями экспрессии и/или активности PCSK9, у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей 5 мг CIVI 008 (цепадакурсен) и 200 мг 5-CNAC, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси и, необязательно, компоненты находятся в капсуле. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, вызванного высокими уровнями экспрессии и/или активности PCSK9, у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей 10 мг CIVI 008 (цепадакурсен) и 200 мг 5-CNAC, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси и, необязательно, компоненты находятся в капсуле. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, вызванного высокими уровнями экспрессии и/или активности PCSK9, у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей 25 мг CIVI 008 (цепадакурсен) и 200 мг 5-CNAC, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси и, необязательно, компоненты находятся в капсуле. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, вызванного высокими уровнями экспрессии и/или активности

PCSK9, у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей 30 мг CIVI 008 (цепадакурсен) и 200 мг 5-CNAC, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси и, необязательно, компоненты находятся в капсуле.

**[202]** В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей CIVI 008 (цепадакурсен) и 5-CNAC в соотношении 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40 или 1:50, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей CIVI 008 (цепадакурсен) и 5-CNAC в соотношении 1:5, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей CIVI 008 (цепадакурсен) и 5-CNAC в соотношении 1:10, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей CIVI 008 (цепадакурсен) и 5-CNAC в соотношении 1:20, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей CIVI 008 (цепадакурсен) и 5-CNAC в соотношении 1:40, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси.

**[203]** В некоторых аспектах, настоящее изобретение обеспечивает капсулу, содержащую CIVI 008 (цепадакурсен) и 5-CNAC в соотношении 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40 или 1:50, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к капсуле, содержащей CIVI 008 (цепадакурсен) и 5-CNAC в соотношении 1:5, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к капсуле, содержащей CIVI 008 (цепадакурсен) и 5-CNAC в соотношении 1:10, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к капсуле, содержащей CIVI 008 (цепадакурсен) и 5-CNAC в соотношении 1:20, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к капсуле, содержащей CIVI 008 (цепадакурсен) и 5-CNAC в соотношении 1:40, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси.

**[204]** В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, вызванного высокими уровнями экспрессии и/или активности PCSK9, у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение эффективного

количества фармацевтической композиции, содержащей CIVI 008 (цепадакурсен) и 5-CNAC в соотношении 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40 или 1:50, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси и, необязательно, компоненты находятся в капсуле. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, вызванного высокими уровнями экспрессии и/или активности PCSK9, у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей CIVI 008 (цепадакурсен) и 5-CNAC в соотношении 1:5, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси и, необязательно, компоненты находятся в капсуле. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, вызванного высокими уровнями экспрессии и/или активности PCSK9, у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей CIVI 008 (цепадакурсен) и 5-CNAC в соотношении 1:10, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси и, необязательно, компоненты находятся в капсуле. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, вызванного высокими уровнями экспрессии и/или активности PCSK9, у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей CIVI 008 (цепадакурсен) и 5-CNAC в соотношении 1:20, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси и, необязательно, компоненты находятся в капсуле. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, вызванного высокими уровнями экспрессии и/или активности PCSK9, у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей CIVI 008 (цепадакурсен) и 5-CNAC в соотношении 1:40, при этом оба компонента находятся в форме сухой смеси и, необязательно, компоненты находятся в капсуле.

**[205]** Настоящее изобретение также обеспечивает набор, содержащий фармацевтическую композицию для перорального применения согласно настоящему описанию (например, включающую CIVI 008 и средство для пероральной доставки, такое как SNAC или 5-CNAC), и письменные инструкции, указывающие, например, что фармацевтическую композицию для перорального применения можно принимать до еды.

**[206]** В некоторых аспектах, пероральные фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, содержащий антисмысловой олигомер длиной от 16 до 22 последовательных нуклеотидов, при этом

последовательность антисмыслового олигомера содержит непрерывную последовательность длиной 16 нуклеотидов, которая на 100% комплементарна последовательности SEQ ID NO: 31 (или другой подходящей целевой области PCSK9, описанной в настоящем документе), и при этом антисмысловый олигомер представляет собой гэпмер (например, гэпмер 3-10-3), содержащий по меньшей мере одно звено LNA и по меньшей мере один ненуклеотидный или неполинуклеотидный фрагмент (например, фрагмент, нацеленный на печень, такой как GalNAc), ковалентно присоединенный к указанному антисмысловому олигомеру непосредственно или через линкер, расположенный между непрерывной последовательностью олигомера и ненуклеотидным или неполинуклеотидным фрагментом, при этом конъюгат антисмыслового олигонуклеотида нацелен на РНК, кодирующую PCSK9.

**[207]** В некоторых аспектах, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида содержит или состоит из SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19. В некоторых аспектах, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида представляет собой фармацевтически приемлемую соль конъюгата антисмыслового олигонуклеотида, раскрытого в настоящем документе, например, антисмысловый олигонуклеотидный конъюгат SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19. В некоторых аспектах, соль представляет собой натриевую соль. В некоторых аспектах, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида содержит ион натрия на звено нуклеотида. Таким образом, в конкретном аспекте антисмысловый олигонуклеотид по настоящему изобретению представляет собой натриевую соль SEQ ID NO: 19, обозначенную CIVI 008, которая представляет собой гексадеканатриевую соль конъюгата антисмыслового олигонуклеотида SEQ ID NO: 19, как показано на **ФИГ. 18В**.

**[208]** Тип конъюгатов олигонуклеотидов в пероральных фармацевтических композициях по настоящему изобретению, которые можно использовать для нацеливания на нуклеиновую кислоту, кодирующую белок PCSK9, например, РНК, не ограничивается антисмысловыми олигонуклеотидами (АСО). В некоторых аспектах, как более подробно описано ниже, олигомер в олигонуклеотидном конъюгате по настоящему изобретению может представлять собой миРНК, кшРНК, аптамер или любую нуклеиновую кислоту, способную модулировать экспрессию и/или активность PCSK9. В некоторых аспектах, олигомер в олигонуклеотидном конъюгате по настоящему изобретению может быть мономером или мультимером, например, множественными сцепленными звеньями олигомера по настоящему изобретению, например, олигомером, полученным из SEQ ID NO:26, например, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3. Соответственно, в некоторых аспектах, олигомер содержит несколько сцепленных копий SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, при

этом расщепляемые линкеры расположены между каждым звеном АСО в мультимерном олигомере. В некоторых аспектах, олигомеры по настоящему изобретению могут быть одноцепочечными или двухцепочечными.

**[209]** В некоторых аспектах, олигомеры или конъюгаты олигонуклеотидов, раскрытые в настоящем документе, могут быть нацелены на РНК, например, пре-мРНК, сплайс-вариант пре-мРНК или зрелую мРНК. В некоторых аспектах, РНК, например, пре-мРНК, сплайс-вариант пре-мРНК или зрелая мРНК, соответствует аллельному варианту нормального гена PCSK9. В некоторых аспектах, РНК, например, пре-мРНК, сплайс-вариант пре-мРНК или зрелая мРНК, соответствует мутанту нормального гена PCSK9. В некоторых аспектах, мутант представляет собой мутант с приобретением функции. В некоторых аспектах, может быть желательным ингибировать экспрессию и/или активность мутанта с усилением функции, чтобы снизить активность PCSK9. Однако в некоторых аспектах, ингибирование экспрессии мутантов с потерей функции может быть желательным, если экспрессия мутантной формы может быть вредной или приводит к накоплению отложений мутантного или неактивного белка PCSK9.

**[210]** В некоторых аспектах, олигомер или конъюгат олигонуклеотида, раскрытые в настоящем документе, могут нацеливаться на последовательность в экзоне PCSK9. В некоторых аспектах, олигомер или конъюгат олигонуклеотида, раскрытые в настоящем документе, могут нацеливаться на последовательность в интроне PCSK9. В некоторых аспектах, олигомер или конъюгат олигонуклеотида, раскрытые в настоящем документе, могут нацеливаться на последовательность, содержащую соединение между экзоном и интроном. В некоторых аспектах, олигомер или конъюгат олигонуклеотида, раскрытые в настоящем документе, могут нацеливаться на последовательность выше от 5'-конца открытой рамки считывания, кодирующей PCSK9. В некоторых аспектах, раскрытый в настоящем документе олигомер или конъюгат олигонуклеотида, раскрытые в настоящем документе, могут нацеливаться на последовательность ниже 3'-конца открытой рамки считывания, кодирующей PCSK9.

**[211]** В разделах II (Антисмысловые олигомеры) и III (Конъюгаты олигонуклеотидов) представлены олигомеры (например, антисмысловые олигонуклеотиды, АСО) и конъюгаты олигонуклеотидов (например, конъюгаты антисмысловых олигонуклеотидов), которые можно использовать в пероральных фармацевтических композициях по настоящему изобретению. Таким образом, понятно, что любые антисмысловые олигомеры (например, олигомер SEQ ID NO: 2 или 3) и/или конъюгаты антисмысловых олигонуклеотидов (например, конъюгаты олигонуклеотида SEQ ID NO: 18 или 19) можно

комбинировать с по меньшей мере одним средством для пероральной доставки, описанный в настоящем документе, например, SNAC, C10 или 5-CNAC, для получения пероральной фармацевтической композиции по настоящему изобретению (например, таблетки или капсулы, содержащей, например, CIVI 008 и SNAC или 5-CNAC). Такие пероральные фармацевтические композиции могут также содержать фармацевтически приемлемые разбавители, носители, соли или адъюванты, раскрытые в настоящем документе или известные в данной области. Например, в WO 2007/031091 представлены подходящие фармацевтически приемлемые разбавители, носители и адъюванты, подходящие дозировки, составы, способы введения, композиции, лекарственные формы, комбинации с другими терапевтическими агентами и пролекарственные составы, которые можно использовать в пероральных фармацевтических композициях настоящего описания.

**[212]** Пероральные антисмысловые фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем документе, можно использовать для лечения заболеваний или состояний, вызванных аномальными уровнями экспрессии и/или активностью PCSK9. Соответственно, в настоящем изобретении предложены способы лечения заболевания или состояния, вызванного аномальными уровнями экспрессии и/или активности PCSK9 у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение эффективного количества пероральной фармацевтической композиции, раскрытой в настоящем документе (например, пероральной фармацевтической композиции, содержащей конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, такой как CIVI 008, и средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC), субъекту, при этом введение фармацевтической композиции снижает уровень PCSK9 в сыворотке и/или снижает уровень холестерина ЛПНП в сыворотке у субъекта.

**[213]** В некоторых аспектах, заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из атеросклероза, гиперхолестеринемии (например, наследственной гиперхолестеринемии или гиперхолестеринемии, резистентной к статинам), дисбаланса холестерина ЛПВП/ЛПНП, дислипидемии (например, FCHL или приобретенной гиперлипидемии), CAD и CHD. Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения заболевания или состояния, выбранного из группы, состоящей из атеросклероза, гиперхолестеринемии (например, наследственной гиперхолестеринемии или гиперхолестеринемии, устойчивой к статинам), дисбаланса холестерина ЛПВП/ЛПНП, дислипидемии (например, FCHL или приобретенной гиперлипидемии), CAD и CHD у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение эффективного

количества пероральной фармацевтической композиции, раскрытой в настоящем документе (например, пероральной фармацевтической композиции, содержащей конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, такой как CIVI 008, и средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC).

**[214]** Настоящее изобретение также относится к способу получения пероральной фармацевтической композиции, включающий смешивание (i) антисмыслового олигомера или конъюгата антисмыслового олигонуклеотида, раскрытых в настоящем документе (например, CIVI 008); и (ii) средства для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC).

**[215]** В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC) ковалентно присоединено к антисмысловому олигомеру или конъюгату антисмыслового олигонуклеотида, описанному в настоящем документе (например, CIVI 008), либо непосредственно, либо через линкер или комбинацию линкеров, при этом линкер или комбинация линкеров может содержать расщепляемый линкер. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC) ковалентно присоединено к фрагменту олигомера непосредственно или через спейсер. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC) ковалентно присоединено к нуклеотидному или полинуклеотидному фрагменту конъюгата антисмыслового олигонуклеотида, раскрытого в настоящем документе (например, фрагмент GalNAc CIVI 008), непосредственно или через линкер, спейсер или их комбинацию. Соответственно, в некоторых аспектах, средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC) или их комбинация присоединены, например, к фрагменту GalNAc конъюгата, содержащему расщепляемый линкер. Расщепление расщепляемого линкера или их комбинации может высвобождать как GalNAc, так и средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC) из конъюгата. В других аспектах фрагмент GalNAc и средство для пероральной доставки присоединены через два отдельных расщепляемых линкера, которые могут быть одинаковыми или разными. В некоторых аспектах, оба расщепляемых линкера могут расщепляться по одному и тому же механизму (например, два линкера чувствительны к уровню pH). В других аспектах каждый расщепляемый линкер может расщепляться по другому механизму (например, линкер может представлять собой линкер, чувствительный к уровню pH, а второй линкер может расщепляться ферментативно, например, эстеразами).

**[216]** В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC) может быть ковалентно присоединено к 5'-концу олигомерного фрагмента, раскрытого в настоящем документе. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC) может быть ковалентно присоединено к 3'-концу олигомерного фрагмента, раскрытого в настоящем документе. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC) может быть ковалентно присоединено непосредственно к 5'- или 3'-концу олигомерного фрагмента, раскрытого в настоящем документе (например, к 5'- или 3'-нуклеотидам). В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC) может быть ковалентно присоединено к 5'- или 3'-концу олигомерного фрагмента, раскрытого в настоящем документе, опосредованно к 5'- или 3'-нуклеотиду через линкер, спейсер или их комбинацию.

**[217]** В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC) может быть ковалентно присоединено к конъюгату антисмыслового олигонуклеотида, раскрытого в настоящем документе. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC) может быть ковалентно присоединено к олигомерному фрагменту конъюгата антисмыслового олигонуклеотида, раскрытого в настоящем документе. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC) может быть ковалентно присоединено к ненуклеотидному или неполинуклеотидному фрагменту (например, фрагменту GalNAc) конъюгата антисмыслового олигонуклеотида, раскрытого в настоящем документе.

**[218]** В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC) может быть ковалентно присоединено к конъюгату антисмыслового олигонуклеотида, раскрытому в настоящем документе, посредством линкера, спейсера или их комбинации. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC) может быть ковалентно присоединено к олигомерному фрагменту конъюгата антисмыслового олигонуклеотида, раскрытого в настоящем документе, посредством линкера, спейсера или их комбинации. В некоторых аспектах, средство для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC) может быть ковалентно присоединено к ненуклеотидному или неполинуклеотидному фрагменту (например, фрагменту GalNAc) конъюгата антисмыслового олигонуклеотида, описанного в настоящем документе, посредством линкера, спейсера или их комбинации.

**[219]** В некоторых аспектах, олигомерный фрагмент, раскрытый в настоящем документе, или конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, раскрытый в настоящем документе,

может быть ковалентно присоединен к более чем одному средству для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC), раскрытому в настоящем документе. В некоторых аспектах, олигомерный фрагмент, раскрытый в настоящем документе, или конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, раскрытый в настоящем документе, может иметь более одного средства для пероральной доставки (например, SNAC, C10 или 5-CNAC), раскрытых в настоящем документе, ковалентно присоединенных в разных положениях (например, средство для пероральной доставки, раскрытое в настоящем документе, присоединено к олигомеру, и средство для пероральной доставки, присоединено к фрагменту GalNAc).

## **II. Олигомеры**

**[220]** В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению представляет собой гэдмер LNA длиной от 16 до 20 нуклеотидов и содержит непрерывную последовательность из 16 нуклеотидов, которые комплементарны соответствующей длине SEQ ID NO 31. Также раскрыты олигомеры, содержащие непрерывную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29 и 44. Антисмысловые олигомеры или конъюгаты по настоящему изобретению нацелены на PCSK9, и как таковые они способны подавлять экспрессию и/или ингибировать PCSK9, такой как PCSK9, у человека или в клетке, экспрессирующей PCSK9. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению может иметь длину 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 нуклеотида. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению имеет длину более 14 нуклеотидов. В некоторых аспектах, межнуклеозидные связи непрерывной последовательности из 10-16 нуклеотидов, которые комплементарны соответствующей длине SEQ ID NO: 33, или 34, или 45, могут быть фосфоротиоатными связями.

**[221]** В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению (например, олигомер, комплементарный SEQ ID NO: 31) содержит, состоит или по существу состоит из непрерывной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3.

**[222]** В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению (например, олигомер, комплементарный SEQ ID NO: 31) содержит 10-16 нуклеозидов, связанных фосфоротиоатными связями. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению (например, олигомер, комплементарный SEQ ID NO: 31) содержит более 14 нуклеозидов, связанных фосфоротиоатными связями. В некоторых аспектах, олигомер

(например, олигомер, комплементарный SEQ ID NO: 31) имеет длину 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 нуклеотида.

**[223]** В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению (например, олигомер, комплементарный SEQ ID NO: 31) представляет собой гэтмер LNA, содержащий непрерывную последовательность из более чем 14 нуклеотидов, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 нуклеотида, которые комплементарны соответствующей длине SEQ ID NO 31, где непрерывная последовательность содержит аналоги нуклеотидов. В конкретном аспекте длина олигомера составляет 16 нуклеотидов. В одном аспекте олигомер по настоящему изобретению содержит аналоги нуклеотидов, усиливающие аффинность. В некоторых аспектах, аналоги нуклеотидов представляют собой нуклеотиды с модифицированным сахаром, такие как нуклеотиды с модифицированным сахаром, независимо или зависимо выбраны из группы, состоящей из 2'-О-алкил-РНК звеньев, 2'-ОМе-РНК звеньев, 2'-амино-ДНК звеньев и 2'-фтор-ДНК звеньев.

**[224]** В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению (например, олигомер, комплементарный SEQ ID NO: 31) представляет собой гэтмерный олигонуклеотид LNA. В некоторых аспектах, гэтмер LNA содержит крыло с каждой стороны (5' и 3') из 2-4 аналогов нуклеотидов, предпочтительно аналогов LNA. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению (например, олигомер, комплементарный SEQ ID NO: 31) может необязательно содержать еще от 1 до 6 нуклеотидов (например, один, два, три, четыре, пять или шесть нуклеотидов), которые может образовывать или содержать биорасщепляемую нуклеотидную область, такую как фосфатный нуклеотидный линкер. В некоторых аспектах, биорасщепляемая нуклеотидная область образована коротким отрезком нуклеотидов (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов), которые являются физиологически лабильными. Этого можно достичь, используя фосфодиэфирные связи с нуклеозидами ДНК/РНК, или, если можно сохранить физиологическую устойчивость, можно использовать другие нуклеозиды. Физиологическую лабильность можно измерить, используя экстракт печени, например, как показано в Примере 6.

**[225]** В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению содержит непрерывную последовательность из 16 нуклеотидов, которые комплементарны соответствующей длине SEQ ID NO 31 (первая область или область А). Олигомер по настоящему изобретению может содержать дополнительную нуклеотидную область. В некоторых аспектах, дополнительная нуклеотидная область содержит биорасщепляемую

нуклеотидную область, такую как последовательность фосфатных нуклеотидов (вторая область, область В), которая может ковалентно связывать область А с нуклеотидной частью, такой как группа конъюгата, (а третья область, или область С). В некоторых аспектах, непрерывная нуклеотидная последовательность олигомера по настоящему изобретению (область А) напрямую ковалентно связана с областью С. В некоторых аспектах, область С является биорасщепляемой.

**[226]** В некоторых аспектах, олигомер включает или состоит из непрерывной нуклеотидной последовательности длиной от 16 до 22, например, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 нуклеотидов, например, длиной 16 нуклеотидов. Соответственно, в некоторых аспектах, олигомер может относиться к объединенной длине области А и области В, например, 16-22 нуклеотида (например, 16 нуклеотидов) от области А и, например, от 1 до 6 нуклеотидов от области В.

**[227]** В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению не содержит РНК (звенья), например, в некоторых аспектах, он может содержать только звенья ДНК. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению содержит звенья ДНК и РНК. В некоторых аспектах, олигомер согласно настоящему изобретению, первая область олигомера или первая и вторая области олигомера вместе (например, в виде одной непрерывной последовательности) представляют собой линейную молекулу. В некоторых аспектах, олигомер согласно настоящему изобретению, первую область олигомера или первую и вторую область олигомера вместе (например, в виде одной непрерывной последовательности) синтезируют в виде линейной молекулы. Таким образом, в некоторых аспектах, олигомер может представлять собой одноцепочечную молекулу. В некоторых аспектах, олигомер не содержит короткие участки, например, по меньшей мере из 3, 4 или 5 смежных нуклеотидов, которые комплементарны эквивалентным участкам в том же олигомере (т.е. дуплексам).

**[228]** В некоторых аспектах, олигомер не является двухцепочечной нуклеиновой кислотой. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению не является миРНК. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению не является кшРНК. В некоторых аспектах, олигомер представляет собой двухцепочечную нуклеиновую кислоту. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению представляет собой миРНК. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению представляет собой кшРНК.

**[229]** Некоторые аспекты относятся к олигомеру по настоящему изобретению в виде антисмыслового олигонуклеотида (АСО). В некоторых аспектах, олигомер по настоящему

изобретению является мультимерным. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению представляет собой мультимерный АСО, например, он может включать несколько связанных олигомеров по настоящему изобретению. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 сцепленных олигомеров. В некоторых аспектах, конкатенированные олигомеры связаны через расщепляемые линкеры, расположенные между каждым звеном АСО в мультимере АСО.

**[230]** Термины «соответствует» и «отвечают» применительно к сравнению двух олигонуклеотидов, раскрытых в настоящем документе, относятся к сравнению между нуклеотидной последовательностью олигомера (т.е. последовательностью азотистых оснований или оснований) по настоящему изобретению и обратный комплемент целевой нуклеиновой кислоты или ее субобласти (например, SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34 или 45). Аналогии нуклеотидов сравнивают непосредственно с их эквивалентами или соответствующими нуклеотидами. В некоторых аспектах, олигомеры (или их первая область) комплементарны целевой области или ее субобласти (например, SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34 или 45), например, полностью комплементарны.

### **II.a Последовательности олигомеров**

**[231]** В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению может нацеливаться на целевую область, раскрытую в ТАБЛИЦЕ 1А. В ТАБЛИЦЕ 1А представлены последовательности целевых областей, а также их положения в мРНК PCSK9. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению содержит область комплементарности, которая комплементарна по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 нуклеотидам одной из целевых последовательностей ТАБЛИЦЫ 1А. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению содержит область комплементарности, которая комплементарна по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 нуклеотидам одной из целевых последовательностей ТАБЛИЦЫ 1А, где комплементарная область находится на 5'-конце олигомера. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению содержит область комплементарности, которая комплементарна по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 нуклеотидам одной из целевых последовательностей ТАБЛИЦЫ 1А, где комплементарная область находится на 3'-конце олигомера. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению содержит область комплементарности, которая комплементарна по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 нуклеотидам одной из целевых

последовательностей ТАБЛИЦЫ 1А, где комплементарная область находится на 5'-конце олигомера, и при этом олигомер имеет длину 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению содержит область комплементарности, которая комплементарна по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 нуклеотидам одной из целевых последовательностей ТАБЛИЦЫ 1А, где комплементарная область находится на 3'-конце олигомера, и при этом олигомер имеет длину 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов.

**ТАБЛИЦА 1А:** Последовательности целевого PCSK9

SEQ ID NO	Целевая последовательность	Длина	Положение в мРНК PCSK9
30	UGGGUUUUGUAGCA	14	3643-3656
31	UGGGUUUUGUAGCAUU	16	3643-3658
32	CCAAGCUCACACAGC	15	3251-3265
33	CCAAGCUCACACAGCA	16	3251-3266
34	GGAACACAGACCAGGA	16	3373-3388
45	CGCUUCCACAGAC	13	1005-1017

**[232]** ТАБЛИЦА 1В показывает SEQ ID NO:25-29 и 44, которые представляют собой последовательности оснований или последовательность мотива азотистых оснований. Например, SEQ ID NO: 26 представляет собой 16-мерную последовательность, нацеленную на SEQ ID NO: 31. В некоторых аспектах, последовательность мотива азотистого основания может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более 20 нуклеотидов, комплементарных удлинённому с 5'-конца, 3'-концу или обоим участкам последовательности мотива, представленной в ТАБЛИЦА 1В. Последовательности олигомеров по настоящему изобретению получены из последовательностей мотивов, раскрытых в настоящем документе, которые содержат определенный набор аналогов азотистых оснований и/или межнуклеозидных связей.

**ТАБЛИЦА 1В:** Последовательности мотивов.

SEQ ID NO	Последовательность мотива	Положение в мРНК PCSK9	SEQ ID NO целевой последовательности
25	tgctacaaaaccsa	3643-3656	30
26	aatgctacaaaaccsa	3643-3658	31
27	gctgtgtgagcttg	3251-3265	32
28	tgctgtgtgagcttg	3251-3266	33
29	tctgtgtgtgtcc	3373-3388	34
44	gtctgtggaagcg	1005-1017	45

[233] В ТАБЛИЦЕ 1С показаны разные последовательности олигомеров, их формы конъюгатов и мишени, соответствующие целевым областям гена PCSK9.

ТАБЛИЦА 1С: Олигомеры и конъюгаты

SEQ ID NO	Последовательность олигомера	Конъюгат			Мишень Положение в мРНК PCSK9
		PO	Chol-C6	GalNAc	
1	TGctacaaaacCCA				3643-3656
2	AATgctacaaaCCCA				3643-3658
3	AATgctacaaaacCCA				3643-3658
4	GCtgtgtgagcttGG				3251-3265
5	TGctgtgtgagctTGG				3251-3266
6	TGCTgtgtgagctTGG				3251-3266
7	TCCtggctctgtgtTCC				3373-3388
8	TCCtggctctgtgttCC				3373-3388
9	TGctacaaaacCCA	Да	Да		3643-3656
10	AATgctacaaaCCCA	Да	Да		3643-3658
11	AATgctacaaaacCCA	Да	Да		3643-3658
12	GCtgtgtgagcttGG	Да	Да		3251-3265
13	TGctgtgtgagctTGG	Да	Да		3251-3266
14	TGCTgtgtgagctTGG	Да	Да		3251-3266
15	TCCtggctctgtgtTCC	Да	Да		3373-3388
16	TCCtggctctgtgttCC	Да	Да		3373-3388
17	TGctacaaaacCCA			Да	3643-3656
18	AATgctacaaaCCCA			Да	3643-3658
19	AATgctacaaaacCCA			Да	3643-3658
20	GCtgtgtgagcttGG			Да	3251-3265
21	TGctgtgtgagctTGG			Да	3251-3266
22	TGCTgtgtgagctTGG			Да	3251-3266
23	TCCtggctctgtgtTCC			Да	3373-3388
24	TCCtggctctgtgttCC			Да	3373-3388
40	GTctgtggaaGCG				1005-1017
41	GTctgtggaaGCG		Да		1005-1017
42	GTctgtggaaGCG	Да	Да		1005-1017
43	GTctgtggaaGCG	Да	Да		1005-1017

[234] SEQ ID NO: 1 представляет собой SPC5001, антисмысловый олигомер, раскрытый в WO 2011/009697, который, как известно, вызывает тяжелую почечную токсичность при введении человеку. SEQ ID NO 1-24 и 40-43 представляют собой олигомеры, содержащие аналоги нуклеотидов, такие как олигомеры гэнмеров LNA, при этом строчные буквы представляют собой звенья ДНК (нуклеозид/нуклеотид), а заглавные буквы представляют собой звенья LNA. В некоторых аспектах, все С LNA представляют собой 5-метилцитозин. В некоторых аспектах, все звено LNA представляют собой бета-D-

оксиLNA. В некоторых аспектах, все межнуклеозидные связи между нуклеозидами SEQ ID NO: 1-24 и 40-43 представляют собой тиофосфатные связи. В некоторых аспектах, фосфоротиоатные связи присутствуют только в первой и/или второй 5'-фосфотиоатных связях. В некоторых аспектах, фосфоротиоатные связи присутствуют только в первой и/или второй 3'-фосфотиоатных связях. В некоторых аспектах, тиофосфатные связи присутствуют в первой и/или второй 5'-фосфотиоатной связи и в первой и/или второй 3'-фосфотиоатной связи.

**[235]** SEQ ID NO: 1-24 и 40-43 представляют собой гэдмеры, при этом каждое крыло содержит 2, 3 или 4 звена LNA. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению соответствует варианту SEQ ID NO: 1-24 и 40-43, где вариант содержит 1, 2, 3 или 4 дополнительных звена LNA в 5'-крыле гэдмера. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению соответствует варианту SEQ ID NO: 1-24 и 40-43, где вариант содержит 1, 2, 3 или 4 дополнительных звена LNA в 3'-крыле гэдмера. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению соответствует варианту SEQ ID NO: 1-24 и 40-43, где вариант содержит 1, 2, 3 или 4 дополнительных звена LNA в 5'-крыле гэдмера и 1, 2, 3 или 4 дополнительных звена LNA в 3'-крыле гэдмера. В некоторых аспектах, звена LNA гэдмера, раскрытого в настоящем документе, например, гэдмер ТАБЛИЦА 1С или его вариант, могут представлять собой окси-LNA, тио-LNA, аминок-5 LNA, 5'-метил-LNA, ENA, сЕТ или сМОЕ.

**[236]** SEQ ID NO: 9-16 и 41-43 включают олигомер (как указано в SEQ ID), а также конъюгат холестерина, который может быть ковалентно связан с олигомером на 5'- или 3'-конце олигомера, необязательно через биорасщепляемый линкер, такой как фосфатный нуклеозидный линкер. В некоторых аспектах, конъюгат холестерина связан на 5'-конце олигомера. SEQ ID NO: 17-24 включают олигомер (как указано в SEQ ID), а также конъюгат GalNAc, который может быть ковалентно связан с 5'- или 3'-концом олигомера, необязательно через биорасщепляемый линкер, такой как фосфатный нуклеозидный линкер или расщепляемый пептидный линкер. В некоторых аспектах, конъюгат GalNAc связан на 5'-конце олигомера. Конкретные олигомеры и конъюгаты, используемые в настоящем документе, проиллюстрированы на **ФИГ. 3** (неконъюгированные олигомеры), **ФИГ. 4** (конъюгаты холестерина) и **ФИГ. 5А, 5В и 5С** (конъюгаты GalNAc). Другие примеры фрагментов конъюгата, которые можно использовать с олигомерами по настоящему изобретению, проиллюстрированы на **ФИГ. 1А, 1С и 1С** и **ФИГ. 2**, и описан в разделе «Конъюгированные фрагменты GalNAc» ниже.

**[237]** ТАБЛИЦА 2 обеспечивает определенные комбинации олигомера и конъюгатов.

**ТАБЛИЦА 2:** Комбинации фрагментов олигомер/конъюгат

SEQ ID NO	Номер фрагмента конъюгата (см. ФИГ. 1А-1С)											
	Conj1	Conj2	Conj3	Conj4	Conj1a	Conj2a	Conj3a	Conj4a	Conj5	Conj6	Conj5a	Conj6a
2	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C70	C71
3	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C72	C73
4	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C74	C75
5	C30	C31	C32	C33	C34	C35	C36	C37	C38	C39	C76	C77
6	C40	C41	C42	C43	C44	C45	C46	C47	C48	C49	C78	C79
7	C50	C51	C52	C53	C54	C55	C56	C57	C58	C59	C80	C81
8	C60	C61	C62	C63	C64	C65	C66	C67	C68	C69	C82	C83

**[238]** Конъюгаты олигомеров, представленные ТАБЛИЦЕ 2, соответствуют олигомерам SEQ ID NO: 1-8, конъюгированным через любой их 5'-конец с частью конъюгата, представленного на **ФИГ. 1А, ФИГ. 1В, ФИГ. 1С** или **ФИГ. 2**. Олигомер ковалентно присоединен к положению, указанному волнистой линией на **ФИГ. 1А, ФИГ. 1В, ФИГ. 1С** или **ФИГ. 2**. В некоторых аспектах, фрагмент конъюгата присоединен к 3'-концу олигомера.

**[239]** **ФИГ. 5А, 5В** и **5С** показывают комбинацию Conj2a с указанными выше SEQ ID NO. **ФИГ. 5В** и **5С** представляют собой два детальных примера соединений на **ФИГ. 5А** и соответствуют конъюгатам SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19 соответственно.

**[240]** В некоторых аспектах, между фрагментом конъюгата (В) и олигомером (А) может присутствовать необязательный биорасщепляемый линкер (С). Для Conj1-4 и 1a-4a сам конъюгат GalNAc является биорасщепляемым с использованием пептидного линкера в кластере GalNAc, и как таковой дополнительный биорасщепляемый линкер (В) может использоваться или не использоваться. В некоторых аспектах, включение биорасщепляемого линкера (В), такого как раскрытые в настоящем документе линкеры фосфатных нуклеотидов, может повышать активность конъюгатов кластерных олигомеров GalNAc. На **ФИГ. 4** показана комбинация Conj5a (холестеролы-С6) с указанными выше SEQ ID NO.

## **II.b Целевая область PCSK9**

**[241]** Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям для перорального введения, содержащим олигомер по настоящему изобретению (например, АСО), который способен модулировать экспрессию гена PCSK9 путем специфического нацеливания на целевую область в РНК PCSK9, например, мРНК. В некоторых аспектах, олигомер способен подавлять экспрессию гена PCSK9 путем связывания с такой целевой областью. Таким образом, в некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению может влиять на экспрессию PCSK9, например, у субъекта-млекопитающего, такого как человек, путем связывания со специфической целевой областью в РНК PCSK9, например, мРНК. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению может влиять на экспрессию PCSK9 в клетке человека, например, в клетке печени, путем связывания с специфической целевой областью в РНК PCSK9, например, мРНК.

**[242]** Термины «целевая нуклеиновая кислота» или «целевая область», используемые в настоящем документе, относятся к подпоследовательности нуклеиновой кислоты, например, РНК, такой как мРНК, кодирующей PCSK9 млекопитающего или его встречающиеся в природе варианты или мутантную форму, например, человеческий PCSK9. В некоторых аспектах, нуклеиновая кислота, кодирующую PCSK9 млекопитающего или его встречающийся в природе вариант или мутантную форму, представляет собой РНК. В некоторых аспектах, РНК представляет собой мРНК, такую как пре-мРНК. В некоторых аспектах, РНК представляет собой зрелую мРНК. Олигомер по настоящему изобретению предпочтительно способен гибридизоваться с целевой нуклеиновой кислотой. Следует понимать, что SEQ ID NO: 46 представляет собой последовательность кДНК и как таковая соответствует целевой последовательности зрелой мРНК, хотя урацил заменен тимидином в последовательностях кДНК.

**[243]** В некоторых аспектах, целевая последовательность соответствует подпоследовательности последовательности, кодирующей PCSK9, указанной в SEQ ID NO: 46. Конкретные целевые последовательности представлены в ТАБЛИЦА 1А выше, например, SEQ ID NO: 30, соответствующие положениям 3643-3656 SEQ ID NO:46; SEQ ID NO: 31, соответствующие положения 3643-3658 SEQ ID NO: 46; SEQ ID NO: 32, соответствующие положения 3251-3265 SEQ ID NO: 46; SEQ ID NO: 33, соответствующие положения 3251-3266 SEQ ID NO: 46; SEQ ID NO: 34, соответствующие положения 3373-3388 SEQ ID NO: 46; и SEQ ID NO: 45, соответствующие положения 1005-1017 SEQ ID NO: 46.

**[244]** В некоторых аспектах, целевая последовательность может простирается на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов за 5'-конец целевой области SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34 или 45. В некоторых аспектах, целевая последовательность может простирается на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов за пределы 3'-конца целевой области SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34 или 45. В некоторых аспектах, целевая последовательность может простирается на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов за пределы 5'-конца и/или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов за пределы 3'-конца целевой области SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34, или 45. В некоторых аспектах, расширенная целевая область перекрывается с 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 нуклеотидами целевой области SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34 или 45.

**[245]** В некоторых аспектах, целевая область содержит или состоит из соответствующей целевой области последовательности, полученной из последовательности мутантного или аллельного варианта гена PCSK9, кодирующей мРНК SEQ ID NO: 46. В других аспектах целевая область может быть субпоследовательностью, присутствующей в другом варианте транскрипта мРНК, кодирующем PCSK9. В некоторых аспектах, целевая область содержит или состоит из соответствующей целевой области последовательности, полученной из последовательности паралога или ортолога гена PCSK9, кодирующего мРНК SEQ ID NO: 46.

**[246]** В одном из аспектов, целевая область соответствует подпоследовательности последовательности, указанной в NCBI Ref Seq, регистрационный номер NM\_174936, то есть, мРНК, кодирующая пропротеин конвертазы субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9) Homo sapiens, вариант транскрипта 1. Это Доступ к записи базы данных NCBI Ref Seq можно получить по адресу [www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore/NM\\_174936](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore/NM_174936), и она полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

**[247]** Кодирующая последовательность PCSK9 в транскрипте мРНК NM\_174936 расположена в положениях 291...2369. Соответственно, в некоторых аспектах, целевая область расположена между положениями 291 и 2369 транскрипта мРНК NM\_174936. В некоторых аспектах, целевая область расположена в пределах 5'-некодирующей области. В некоторых аспектах, целевая область расположена в пределах 3'-некодирующей области. Транскрипт мРНК NM\_174936 включает экзоны, расположенные в позициях 1...497 (экзон 1), 498...689 (экзон 2), 690...813 (экзон 3), 814...947 (экзон 4), 948...1089 (экзон 5), 1090 ...1286 (экзон 6), 1287...1470 (экзон 7), 1471...1644 (экзон 8), 1645...1793 (экзон 9), 1794...1971 (экзон 10), 1972...2153 (экзон 11) и 2154... 3637 (экзон 12). Экзоны



интроном 7. В некоторых аспектах, целевая область содержит соединение между интроном 7 и экзоном 8. В некоторых аспектах, целевая область содержит соединение между экзоном 8 и интроном 8. В некоторых аспектах, целевая область содержит соединение между интроном 8 и экзоном 9. В некоторых аспектах, целевая область содержит соединение между экзоном 9 и интроном 9. В некоторых аспектах, целевая область содержит соединение между интроном 9 и экзоном 10. В некоторых аспектах, целевая область содержит соединение между экзоном 10 и интроном 10. В некоторых аспектах, целевая область содержит соединение между интроном 10 и экзон 11. В некоторых аспектах, целевая область содержит соединение между экзоном 11 и интроном 11. В некоторых аспектах, целевая область содержит соединение между интроном 11 и экзоном 12.

**[250]** В некоторых аспектах, олигомеры по настоящему изобретению связываются с целевой нуклеиновой кислотой (например, SEQ ID NO: 31), и их влияние на экспрессию и/или уровень активности PCSK9 составляет по меньшей мере от около 10% до около 20% снижения экспрессии и/или уровня активности PCSK9 по сравнению с нормальным уровнем экспрессии PCSK9 (например, уровнем экспрессии PCSK9 клетки животного или человека, обработанного физиологическим раствором) и/или нормальным уровнем активности (например, уровнем экспрессии клетки животного или человека, обработанного физиологическим раствором). В некоторых аспектах, снижение экспрессии и/или активности PCSK9 составляет по меньшей мере около 10 %, по меньшей мере около 15 %, по меньшей мере около 20 %, по меньшей мере около 25 %, по меньшей мере около 30 %, по меньшей мере около 35 %, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% по сравнению с нормальным уровнем экспрессии и/или активности. В некоторых аспектах, снижение экспрессии и/или активности составляет около 10%, около 15%, около 20%, около 25%, около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% по сравнению с нормальным уровнем экспрессии и/или активности.

**[251]** В некоторых аспектах, такая модуляция (например, снижение уровня экспрессии и/или активности) наблюдается при использовании концентрации от 0,04 нМ до 25 нМ, например, от 0,8 нМ до 20 нМ концентрации олигомера по настоящему изобретению. В некоторых аспектах, такая модуляция (например, снижение уровня экспрессии и/или активности) наблюдается при использовании по меньшей мере около 0,04 нМ, по меньшей мере около 0,05 нМ, по меньшей мере около 0,06 нМ, по меньшей мере около 0,07 нМ, по меньшей мере около 0,08 нМ, по меньшей мере около 0,09 нМ, по меньшей мере около 0,1 нМ, по меньшей мере около 0,2 нМ, по меньшей мере около 0,3 нМ, по меньшей мере около 0,4 нМ, по меньшей мере около 0,5 нМ, по меньшей мере около 0,6 нМ, по меньшей мере около 0,7 нМ, по меньшей мере около 0,8 нМ, по меньшей мере около 0,9 нМ, по меньшей мере около 1 нМ, по меньшей мере около 2 нМ, по меньшей мере около 3 нМ, по меньшей мере около 4 нМ, по меньшей мере около 5 нМ, по меньшей мере около 6 нМ, по меньшей мере около 7 нМ, по меньшей мере около 8 нМ, по меньшей мере около 9 нМ, по меньшей мере около 10 нМ, по меньшей мере около 11 нМ, по меньшей мере около 12 нМ, по меньшей мере около 13 нМ, по меньшей мере около 14 нМ, по меньшей мере около 15 нМ, по меньшей мере около 16 нМ, по меньшей мере около 17 нМ, по меньшей мере около 18 нМ, по меньшей мере около 19 нМ, по меньшей мере около 20 нМ, по меньшей мере около 21 нМ, по меньшей мере около 22 нМ, по меньшей мере около 23 нМ, по меньшей мере около 24 нМ, по меньшей мере около 25 нМ концентрации олигомера по настоящему изобретению. В некоторых аспектах, такая модуляция (например, снижение уровня экспрессии и/или активности) наблюдается при использовании около 0,04 нМ, около 0,05 нМ, около 0,06 нМ, около 0,07 нМ, около 0,08 нМ, около 0,09 нМ, около 0,1 нМ, около 0,2 нМ, около 0,3 нМ, около 0,4 нМ, около 0,5 нМ, около 0,6 нМ, около 0,7 нМ, около 0,8 нМ, около 0,9 нМ, около 1 нМ, около 2 нМ, около 3 нМ, около 4 нМ, около 5 нМ, около 6 нМ, около 7 нМ, около 8 нМ, около 9 нМ, около 10 нМ, около 11 нМ, около 12 нМ, около 13 нМ, около 14 нМ, около 15 нМ, около 16 нМ, около 17 нМ, около 18 нМ, около 19 нМ, около 20 нМ, около 21 нМ, около 22 нМ, около 23 нМ, около 24 нМ, около 25 нМ концентрации олигомера по настоящему изобретению.

**[252]** В некоторых аспектах, такая модуляция (например, снижение уровня экспрессии и/или активности) наблюдается при использовании от 0,01 до 15 мг/кг, например, от 0,05 до 10 мг/кг, например, от 0,1 до 7,5 мг/кг, например, от 0,25 до 5 мг/кг, например, от 0,5 до 2,5 мг/кг концентрации соединения по настоящему изобретению. В некоторых аспектах, такая модуляция (например, снижение уровня экспрессии и/или активности) наблюдается

при использовании по меньшей мере около 0,01 мг/кг, по меньшей мере около 0,02 мг/кг, по меньшей мере около 0,03 мг/кг, по меньшей мере около 0,04 мг/кг, по меньшей мере около 0,05 мг/кг, по меньшей мере около 0,06 мг/кг, по меньшей мере около 0,07 мг/кг, по меньшей мере около 0,08 мг/кг, по меньшей мере около 0,09 мг/кг, по меньшей мере около 0,1 мг/кг, по меньшей мере около 0,2 мг/кг, по меньшей мере около 0,3 мг/кг, по меньшей мере около 0,4 мг/кг, по меньшей мере около 0,5 мг/кг, по меньшей мере около 0,6 мг/кг, по меньшей мере около 0,7 мг/кг, по меньшей мере около 0,8 мг/кг, по меньшей мере около 0,9 мг/кг, по меньшей мере около 1 мг/кг, по меньшей мере около 1,5 мг/кг, по меньшей мере около 2 мг/кг, по меньшей мере около 2,5 мг/кг, по меньшей мере около 3 мг/кг, по меньшей мере около 4 мг/кг, по меньшей мере около 4,5 мг/кг, по меньшей мере около 5 мг/кг, по меньшей мере около 6 мг/кг, по меньшей мере около 6,5 мг/кг, по меньшей мере около 7 мг/кг, по меньшей мере около 7,5 мг/кг, по меньшей мере около 8 мг/кг, по меньшей мере около 8,5 мг/кг, по меньшей мере около 9 мг/кг, по меньшей мере около 9,5 мг/кг, по меньшей мере около 10 мг/кг, по меньшей мере около 10,5 мг/кг, по меньшей мере около 11 мг/кг, по меньшей мере около 11,5 мг/кг, по меньшей мере около 12 мг/кг, по меньшей мере около 12,5 мг/кг, по меньшей мере около 13 мг/кг, по меньшей мере около 13,5 мг/кг, по меньшей мере около 14 мг/кг, по меньшей мере около 14,5 мг/кг или по меньшей мере около 15 мг/кг концентрации соединения по настоящему изобретению. В некоторых аспектах, такая модуляция (например, снижение уровня экспрессии и/или активности) наблюдается при использовании около 0,01 мг/кг, около 0,02 мг/кг, около 0,03 мг/кг, около 0,04 мг/кг, около 0,05 мг/кг, около 0,06 мг/кг, около 0,07 мг/кг, около 0,08 мг/кг, около 0,09 мг/кг, около 0,1 мг/кг, около 0,2 мг/кг, около 0,3 мг/кг, около 0,4 мг/кг, около 0,5 мг/кг, около 0,6 мг/кг, около 0,7 мг/кг, около 0,8 мг/кг, около 0,9 мг/кг, около 1 мг/кг, около 1,5 мг/кг, около 2 мг/кг, около 2,5 мг/кг, около 3 мг/кг, около 4 мг/кг, около 4,5 мг/кг, около 5 мг/кг, около 6 мг/кг, около 6,5 мг/кг, около 7 мг/кг, около 7,5 мг/кг, около 8 мг/кг, около 8,5 мг/кг, около 9 мг/кг, около 9,5 мг/кг, около 10 мг/кг, около 10,5 мг/кг, около 11 мг/кг, около 11,5 мг/кг, около 12 мг/кг, около 12,5 мг/кг, около 13 мг/кг, около 13,5 мг/кг, около 14 мг/кг, около 14,5 мг/кг или около 15 мг/кг концентрации соединения по настоящему изобретению.

**[253]** В некоторых аспектах, уровень экспрессии и/или активности PCSK9 после введения соединения по настоящему изобретению составляет менее около 2%, менее около 5%, менее около 10%, менее около 15%, менее около 20%, менее около 25%, менее около 30%, менее около 35%, менее около 40%, менее около 45%, менее около 50%, менее около 55%, менее около 60%, менее около 65%, менее около 70%, менее около 75% или

менее около 80% от уровня экспрессии и/или активности PCSK9 до введения соединения по настоящему изобретению.

**[254]** В некоторых аспектах, уровень экспрессии и/или активности PCSK9 после введения соединения по настоящему изобретению составляет от около 2% до около 5%, от около 5% до около 10%, от около 10% до около 15%, от около 15% до около 20%, от около 20% до около 25%, от около 25% до около 30%, от около 30% до около 35%, от около 35% до около 40%, от около 40% до около 45%, от около 45% до около 50%, от около 50% до около 55%, от около 55% до около 60%, от около 60% до около 65%, от около 65% до около 70%, от около 70% до около 75% или от около 75% до около 80% уровня экспрессии и/или активности PCSK9 перед введением соединения по настоящему изобретению.

**[255]** Модуляцию уровня экспрессии можно определить путем измерения уровней белка, например, такими методами, как SDS-PAGE (Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) с последующим вестерн-блоттингом с использованием пригодных антител, выработанных против целевого белка. В качестве альтернативы, модуляция уровней экспрессии может быть определена путем измерения уровней мРНК, например, с помощью нозерн-блоттинга или количественного ОТ-ПЦР. При измерении с помощью уровней мРНК, уровень подавления при использовании соответствующей дозировки, такой как от 0,04 нМ до 25 нМ, например, от 0,8 до 20 нМ концентрации, в некоторых аспектах, обычно составляет от 10 до 20% от нормальных уровней в отсутствие соединения по настоящему изобретению.

**[256]** Таким образом, в настоящем изобретении предложен способ подавления или ингибирования экспрессии белка PCSK9 и/или мРНК *in vitro* или *in vivo* в клетке, которая экспрессирует белок и/или мРНК PCSK9, причем указанный способ включает введение олигомера или конъюгата в соответствии с настоящим изобретением, например, в виде фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению (например, перорального состава, содержащего, например, CIVI 008 и средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC, его производное, фармацевтически приемлемый гидрат, сольват или их соль или любую их комбинацию) в указанную клетку для подавления или ингибирования экспрессии белка PCSK9 и/или мРНК в указанной клетке. Подходящей клеткой является клетка млекопитающего, такая как клетка человека.

## **П.с    Длина**

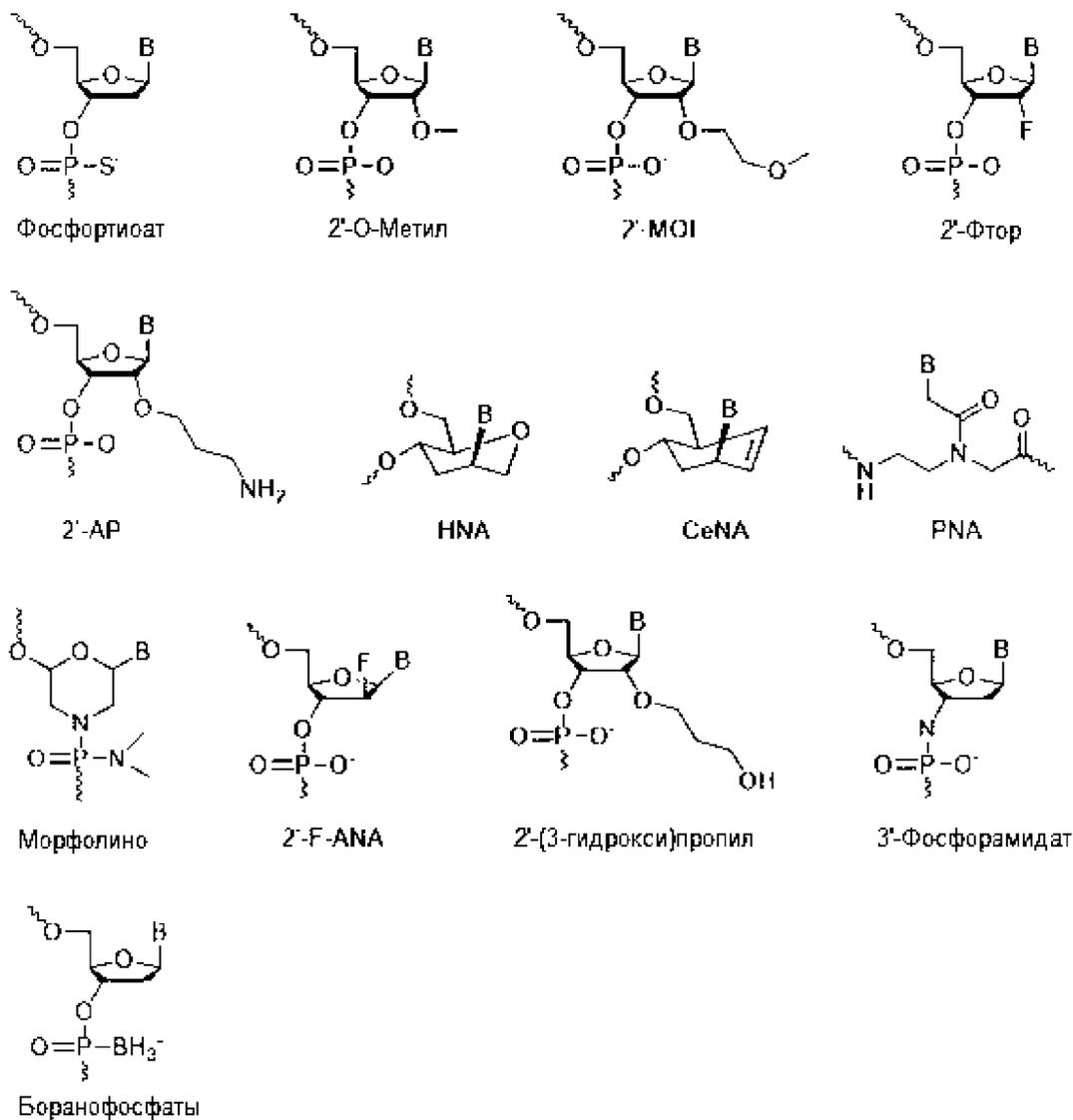
**[257]** Олигомеры по настоящему изобретению могут содержать или состоять из непрерывной нуклеотидной последовательности общей длиной 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 последовательных нуклеотидов. В некоторых аспектах, длина олигомера превышает 22 последовательных нуклеотида. Длины могут включать область А или область А и В. Следует понимать, что в некоторых аспектах, олигомеры по настоящему изобретению могут представлять собой мультимеры, содержащие, например, 2, 3, 4, 5, 6 или более связанных АСО, раскрытых в настоящем документе, которые необязательно могут быть соединены спейсерами или линкерами, содержащими нуклеотидные или ненуклеотидные звенья, расположенные между каждым АСО в мультимере. Соответственно, в некоторых аспектах, олигомеры по настоящему изобретению могут содержать или состоять из непрерывной нуклеотидной последовательности, содержащей в общей сложности по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 35, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 45, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 55, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 65, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 75, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 85, по меньшей мере около 90, по меньшей мере около 95, по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 110, по меньшей мере около 120, по меньшей мере около 130, по меньшей мере около 140, по меньшей мере около 150, по меньшей мере около 160, по меньшей мере около 170, по меньшей мере около 180, по меньшей мере около 190 или по меньшей мере около 200 последовательных нуклеотидов в длину.

**[258]** В некоторых аспектах, олигомеры содержат или состоят из непрерывной нуклеотидной последовательности общей длиной от 16 до 22 последовательных нуклеотидов, например, длиной 16, 17, 18, 18, 20, 21 или 22 последовательных нуклеотидов. В некоторых конкретных аспектах олигомер области А содержит или состоит из непрерывной нуклеотидной последовательности длиной 16 последовательных нуклеотидов.

**[259]** В некоторых аспектах, олигомер согласно настоящему описанию состоит не более чем из 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 смежных нуклеотидов в длину. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению содержит менее 22, менее 21, менее 20, менее 19, менее 18 или менее 17 последовательных нуклеотидов в длину. В некоторых аспектах, олигомер согласно настоящему изобретению состоит из 16 или 17, от 16 до 18, от 16 до 19, от 16 до 20, от 16 до 21 или от 16 до 22 последовательных нуклеотидов в длину.

## **II.d Аналоги нуклеотидов**

[260] В некоторых аспектах, олигомеры по настоящему изобретению содержат не встречающиеся в природе аналоги нуклеотидов, например, нуклеотиды, которые имеют модифицированные фрагменты сахара, такие как бициклические нуклеотиды или 2'-модифицированные нуклеотиды, такие как 2'-замещенные нуклеотиды. Замена встречающихся в природе нуклеотидов неприродными аналогами может придать желаемые характеристики или свойства олигомеру, например, повышенную устойчивость к деградации или стабильность. В некоторых аспектах, аналоги нуклеотидов оказывают функциональное влияние на то, как олигомер работает, ингибируя экспрессию; например, путем создания повышенной аффинности связывания (усиление аффинности) с мишенью и/или повышенной устойчивости к внутриклеточным нуклеазам и/или повышенной легкости транспорта в клетку. Конкретные примеры аналогов нуклеозидов описаны, например, в Freier & Altmann (1997) *Nucl. Acid Res.* 25:4429-4443 и Uhlmann (2000) *Curr. Opinion in Drug Development* 3: 293-213 и на Схеме 1 ниже:



[261] В настоящем изобретении предложены олигомеры, содержащие или состоящие из простой последовательности встречающихся в природе нуклеотидов, предпочтительно 2'-дезоксинуклеотидов (обозначаемых в настоящем документе, как правило, как «ДНК»), но также, возможно, рибонуклеотидов (обозначаемых в настоящем документе, как правило, как «РНК»), или комбинацию таких встречающихся в природе нуклеотидов и одного или нескольких неприродных нуклеотидов, т.е. аналогов нуклеотидов. Такие аналоги нуклеотидов могут подходящим образом усилить аффинность олигомера к целевой последовательности. Примеры аналогов пригодных нуклеотидов показаны в WO 2007/031091, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки или в ссылках, приведенных в данном документе.

[262] Включение в олигомер аналогов нуклеотидов, усиливающих аффинность, таких как LNA или 2'-замещенные сахара, может позволить уменьшить размер специфически

связывающегося олигомера, а также может уменьшить верхний предел размера олигомера. до того, как произойдет неспецифическое или аберрантное связывание. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один аналог нуклеотида. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению содержит по меньшей мере два аналога нуклеотидов. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению содержит аналоги из 3, 4, 5, 6, 7 или 8 нуклеотидов, например, аналоги из 6 или 7 нуклеотидов. В некоторых аспектах, все аналоги нуклеотидов одинаковы. В некоторых аспектах, некоторые аналоги нуклеотидов отличаются. В некоторых аспектах, все нуклеотиды в олигомере являются аналогами нуклеотидов. В некоторых аспектах, когда все нуклеотиды в олигомере являются аналогами нуклеотидов, все аналоги нуклеотидов являются одинаковыми. В некоторых аспектах, когда все нуклеотиды в олигомере являются аналогами нуклеотидов, некоторые из аналогов нуклеотидов отличаются. В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению содержит аналоги нуклеотидов, например, аналог А и аналог В, по определенной схеме, например, АВАВАВАВАВАВАВАВАВАВА.

**[263]** Примеры аналогов нуклеотидов включают модификацию сахарного фрагмента для обеспечения 2'-замещающей группы или для получения бициклической структуры, которая повышает аффинность связывания, а также может обеспечивать повышенную устойчивость к нуклеазам.

**[264]** В некоторых аспектах, аналоги нуклеотидов, присутствующие в антисмысловом олигомере по настоящему изобретению (например, в областях X' и Y', упомянутых в разделе «Конструкция гэммер»), независимо выбраны, например, из: 2'-О-алкил-РНК звеньев, 2'-ОМе-РНК звеньев, 2'-О-алкил-ДНК звеньев, 2'-амино-ДНК звеньев, 2'-фтор-ДНК звеньев, LNA звеньев, звеньев арабинонуклеиновой кислоты (ANA), звеньев 2'-фтор-ANA, звеньев HNA, звеньев INA (интеркалирующая нуклеиновая кислота; Christensen (2002) *Nucl. Acids. Res.* 30: 4918-4925) и 2'-МОЕ звеньев.

**[265]** В некоторых аспектах, аналоги нуклеотидов представляют собой 2'-О-метоксиэтил-РНК (2'-МОЕ), мономеры 2'-фтор-ДНК или аналоги нуклеотидов LNA, и поэтому антисмысловый олигонуклеотид по настоящему изобретению может содержать аналоги нуклеотида, которые независимо выбирают из этих трех типов аналогов или могут включать только один тип аналога, выбранный из трех типов. В некоторых аспектах, по меньшей мере один из указанных аналогов нуклеотида представляет собой 2'-МОЕ-РНК, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидных 2'-МОЕ-РНК звеньев. В некоторых аспектах, по меньшей мере один из указанных аналогов нуклеотида

представляет собой 2'-фтор ДНК, такой как 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидных 2'-фтор ДНК звеньев.

**[266]** В некоторых аспектах, олигомер может представлять собой дуплексную РНК, содержащую смысловую и антисмысловую цепи, где смысловая цепь соответствует образцу 3'АВАВАВАААВВВВАВАВА5', а антисмысловая цепь соответствует образцу 5'ВАВАВАВАВВВВАААВАВАВЗ', где А представляет собой 2'-фтор аналог, а В представляет собой 2-ОМе аналог, и при этом антисмысловая цепь имеет выступающий конец из двух оснований по отношению к смысловой цепи. В некоторых аспектах, 5'-конец смысловой цепи конъюгирован с фрагментом GalNAc. В некоторых аспектах, последние два соединения 5'-конца антисмысловой цепи представляют собой PS.

**[267]** В некоторых аспектах, олигомер может представлять собой дуплексную РНК, содержащую смысловую и антисмысловую цепи, где смысловая цепь соответствует образцу 3'ВВВВВАВААВВВВВВВВВ5', а антисмысловая цепь соответствует образцу 5'ВВВВВВАВАВВВВВВВВВВВЗ', где А представляет собой 2'-фтор аналог, а В представляет собой 2-ОМе аналог, и при этом антисмысловая цепь имеет выступающий конец из двух оснований по отношению к смысловой цепи. В некоторых аспектах, 5'-конец смысловой цепи конъюгирован с фрагментом GalNAc. В некоторых аспектах, последние два соединения на 5'-конце и 3'-конце антисмысловой цепи представляют собой PS, а последние два соединения на 3'-конце смысловой цепи представляют собой PS.

**[268]** В некоторых аспектах, олигомер может представлять собой дуплексную РНК, содержащую смысловую и антисмысловую цепи, при этом смысловая цепь содержит одну или несколько терминальных хирально модифицированных межнуклеотидных соединений на 5'-конце; и антисмысловая цепь содержит одну или несколько концевых хирально модифицированных межнуклеотидных соединений на 5'-конце и одну или несколько концевых хирально модифицированных межнуклеотидных соединений на 3'-конце.

**[269]** В некоторых аспектах, олигомер может представлять собой дуплексную РНК, содержащую смысловую и антисмысловую цепи, последовательность смысловой цепи, имеющую 4-12 асимметричных 2'-О-алкильных модификаций, по меньшей мере 4 из которых встречаются на 4 концевых нуклеотидах 5'-конца; и антисмысловую последовательность, имеющую по меньшей мере 4 асимметричные модификации тиофосфата.

**[270]** В некоторых аспектах, олигомер может представлять собой дуплексную РНК, содержащую первую и вторую последовательности, имеющую первый мономер в первой последовательности и второй мономер во второй последовательности в первых 3, 4, 5 или 6 положениях, либо с 3'-конца, либо с 5'-конца, где первый и второй мономеры выбраны таким образом, что (i) первый и второй мономеры представляют собой встречающиеся в природе рибонуклеотиды или модифицированные рибонуклеотиды, имеющие встречающиеся в природе основания, где рибонуклеотид первого мономера и рибонуклеотид вторых мономеров, занимая комплементарные сайты, не образуя пары и не имеющие значительного уровня Н-связей, образуют неканоническую пару Уотсона-Крика; и (ii) стабильность спаривания мономеров, способствующих образованию дуплекса между первой и второй последовательностями, отличается от стабильности спаривания между первой последовательностью и целевой последовательностью или между второй последовательностью и целевой последовательностью, где дуплексная РНК содержит выступающую последовательность ТТ.

**[271]** В некоторых аспектах, олигомер может представлять собой дуплексную РНК, содержащую: последовательность смысловой цепи, имеющую 4-12 асимметричных 2'-О-алкильных модификаций, по меньшей мере 4 из которых находятся в пределах 6 концевых нуклеотидов 5'-конца; и антисмысловую последовательность, имеющую по меньшей мере 4 асимметричные модификации тиофосфата.

**[272]** В некоторых аспектах, олигомер может представлять собой дуплексную РНК, содержащую: смысловую последовательность, имеющую 4-12 асимметричных 2'-О-алкильных модификаций, по меньшей мере 4 из которых встречаются в пределах 6 концевых нуклеотидов 5'-конца; и антисмысловую последовательность, имеющую по меньшей мере 4 асимметричных фосфоротиоатных модификации, где дуплексная РНК содержит мультивалентную галактозу или поливалентный N-ацетилгалактозамин, и при этом антисмысловая последовательность нацелена на целевую последовательность PCSK9.

**[273]** В некоторых аспектах, олигомер может представлять собой дуплексную РНК для ингибирования экспрессии PCSK9 в клетке, содержащую смысловую последовательность и антисмысловую последовательность, где смысловая последовательность имеет одну или более асимметричных 2'-О алкильных модификаций и антисмысловая последовательность имеет 4-20 фосфоротиоатных модификаций, где дуплексная РНК содержит поливалентную галактозу или мультивалентный N-ацетилгалактозамин, и при

этом антисмысловая последовательность нацелена на последовательность PCSK9 человека.

[274] В некоторых аспектах, олигомер может представлять собой дуплексную РНК для ингибирования экспрессии PCSK9 в клетке, содержащую смысловую последовательность и антисмысловую последовательность, где смысловая последовательность имеет одну или более асимметричных 2'-О алкильных модификаций и антисмысловая последовательность имеет 4-20 фосфоротиоатных модификаций, где антисмысловая последовательность имеет меньше асимметричных 2'-О алкильных модификаций, чем смысловая последовательность, и при этом смысловая последовательность содержит группу конъюгата, и при этом антисмысловая последовательность нацелена на последовательность PCSK9.

[275] В некоторых аспектах, олигомер может представлять собой дуплексную РНК со сниженной активностью ингибирования нецелевой РНК, содержащий: а. антисмысловую цепь, комплементарную целевому гену; и б. смысловую цепь, комплементарную указанной антисмысловой цепи и содержащую по меньшей мере один модифицированный нуклеотид в области, соответствующей целевому сайту расщепления, при этом указанный модифицированный нуклеотид является неосновным; при этом указанная сниженная активность ингибирования нецелевой РНК сопоставима с активностью соответствующего немодифицированного агента дуплексной РНК.

[276] В некоторых аспектах, олигомер может представлять собой дуплексную РНК, способную ингибировать экспрессию PCSK9 *in vivo*, содержащую: (а) смысловую цепь, при этом указанная смысловая цепь содержит (i) чередующийся мотив по меньшей мере с 2 различными химически модифицированными нуклеотидами; и (ii) один или несколько углеводных лигандов; и (б) антисмысловую цепь, при этом указанная антисмысловая цепь содержит (i) чередующийся мотив с по меньшей мере 2 различными химически модифицированными нуклеотидами, при этом чередующийся мотив находится в пределах дуплексной области, и композиция необязательно дополнительно содержит один или несколько выступающих участков и/или кеппирующие группы.

[277] В некоторых аспектах, олигомер может представлять собой дуплексную РНК, способную ингибировать экспрессию PCSK9, содержащую смысловую цепь и антисмысловую цепь, каждая из которых имеет от 14 до 30 нуклеотидов, при этом дуплекс представлен формулой ниже:

смысловая: 5' n<sub>p</sub>-N<sub>a</sub>-(X X X)<sub>i</sub>-N<sub>b</sub>-Y Y Y-N<sub>b</sub>-(Z Z Z)<sub>j</sub>-N<sub>a</sub>-n<sub>q</sub> 3'

антисмысловая: 3' n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'-(X'X'X')<sub>k</sub>-N<sub>b</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>'-(Z'Z'Z')<sub>l</sub>-N<sub>a</sub>'-n<sub>q</sub>' 5' (III)

в которой:

каждый из  $i, j, k$  и  $l$  независимо равен 0 или 1, при условии, что по меньшей мере один из  $i, j, k$  и  $l$  равен 1;

каждый из  $p$  и  $q$  независимо равен 0-6;

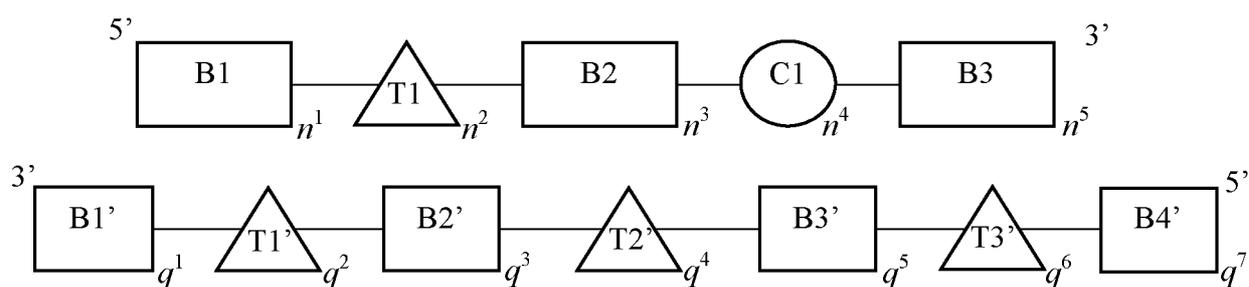
каждый  $N_a$  и  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую от 2 до 20 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо немодифицированы, либо их комбинации, причем каждая последовательность содержит по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида, каждый  $N_b$  и  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-10 модифицированных нуклеотидов;

каждый  $n_p, n_p', n_q$  и  $n_q'$  независимо представляет собой выступающую нуклеотидную последовательность, содержащую 0-6 нуклеотидов; и

$XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y'$  и  $Z'Z'Z'$ , каждый независимо, представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов; и

где модификация  $N_b$  отличается от модификации  $Y$ , а модификация  $N_b'$  отличается от модификации  $Y'$ .

**[278]** В некоторых аспектах, олигомер может представлять собой дуплексную РНК, способную ингибировать экспрессию PCSK9, содержащую смысловую цепь и антисмысловую цепь, каждая из которых имеет от 14 до 40 нуклеотидов, при этом агент дцРНК представлен приведенной ниже формулой:



где:  $B1, B2, B3, B1', B2', B3'$  и  $B4'$ , каждый независимо, представляет собой нуклеотид, содержащий модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O алкила, 2'-замещенного алкокси, 2'-замещенного алкила, 2'-галогена, ENA и BNA/LNA;

$C1$  представляет собой термически дестабилизирующий нуклеотид, выбранный из группы, состоящей из i) нуклеотида, который образует пару несовпадений с противоположным нуклеотидом в антисмысловой цепи, ii) нуклеотида, имеющего

базовую модификацию, и iii) нуклеотида, имеющего модификацию сахара, и помещают в участок, противоположный зародышевой области (положения 2-8) антисмысловой цепи; T1, T1', T2' и T3', каждый независимо, представляет собой нуклеотид, содержащий модификацию, обеспечивающую стерический объем нуклеотида, который меньше, чем стерический объем модификации 2'-ОМе, где модификация находится в 2'-положении рибозного сахара нуклеотида или в положении нерибозного нуклеотида, аналогичном 2'-положению рибозного сахара, и где T1' и T3' разделены 11 нуклеотидами; каждый  $n^1$ ,  $n^3$  и  $q^1$  независимо имеет длину от 4 до 15 нуклеотидов; каждый  $n^5$ ,  $q^3$  и  $q^7$  независимо имеет длину 1-6 нуклеотидов; каждый  $n^2$ ,  $n^4$  и  $q^6$  независимо имеет длину 1-3 нуклеотида(ов);  $q^5$  независимо имеет длину 0-10 нуклеотидов; и каждый  $n^2$ ,  $n^4$  и  $q^4$  независимо имеет длину 0-3 нуклеотида(ов); и где агент дцРНК имеет два тупых конца на обоих концах дуплекса дцРНК.

**[279]** В некоторых аспектах, олигомер может представлять собой дуплексную РНК, способную ингибировать экспрессию PCSK9, содержащую смысловую цепь и антисмысловую цепь, каждая из которых имеет от 14 до 40 нуклеотидов, при этом антисмысловая цепь имеет достаточную комплементарность целевой последовательности для опосредования РНК-интерференции, при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну термодестабилизирующую модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений 5'-области или его предшественника, причем указанная смысловая цепь содержит лиганд ASGPR.

**[280]** В некоторых аспектах, олигомер содержит мотив модификации (например, характер распределения аналогов нуклеотидов вдоль смысловой и антисмысловой последовательностей, межнуклеозидные связи, конъюгированные фрагменты и т. д.), раскрытый в патенте США № 8110674; 8420799; 8809516; 9222091; 9708615; 10273477; 9290760; 10233448 или 9796974; опубликованной заявке США № 2018-0258427A1; или международной публикации WO2018098328A1, все из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

**[281]** В некоторых аспектах, нуклеотидный аналог представляет собой LNA, такой как окси-LNA (такой как бета-D-окси-LNA и альфа-L-окси-LNA) и/или аминокси-LNA (такой как бета-D-аминокси-LNA и альфа-L-аминокси-LNA) и/или тио-LNA (например, бета-D-тио-LNA и альфа-L-тио-LNA) и/или ENA (например, бета-D-ENA и альфа-L-ENA). В некоторых аспектах, LNA представляет собой бета-D-окси-LNA. В некоторых аспектах, в антисмысловом олигонуклеотиде по настоящему изобретению или его непрерывной

нуклеотидной последовательности присутствует только один из вышеуказанных типов аналогов нуклеотидов, например, LNA.

**[282]** Антисмысловой олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одно звено замкнутой нуклеиновой кислоты (LNA), такое как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 звеньев LNA, например, от 3 до 7, или от 4 до 8 звеньев LNA. В некоторых аспектах, по меньшей мере один из аналогов нуклеотидов представляет собой замкнутую нуклеиновую кислоту (LNA); например, по меньшей мере 3, или по меньшей мере 4, или по меньшей мере 5, или по меньшей мере 6, или по меньшей мере 7, или 8 аналогов нуклеотидов могут представлять собой LNA. В некоторых аспектах, все аналоги нуклеотидов могут представлять собой LNA.

**[283]** В некоторых аспектах, антисмысловой олигонуклеотид по настоящему изобретению может содержать как аналоги нуклеотидов (например, LNA), так и ДНК звенья. В некоторых аспектах, общее количество аналогов нуклеотидов (предпочтительно LNA) и ДНК звеньев составляет от 5 до 22, например, от 16 до 18, или от 16 до 20, или от 16 до 22. В некоторых аспектах, общее количество аналогов нуклеотидов (например, LNA) и ДНК звеньев составляют 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22.

**[284]** В некоторых аспектах, нуклеотидная последовательность антисмыслового олигонуклеотида по настоящему изобретению, такая как непрерывная нуклеотидная последовательность, состоит по меньшей мере из одного аналога нуклеотида (LNA), а остальные нуклеотидные звенья представляют собой ДНК звенья. В некоторых аспектах, антисмысловой олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит только аналоги нуклеотидов LNA и встречающиеся в природе нуклеотиды (такие как РНК или ДНК, наиболее предпочтительно нуклеотиды ДНК), необязательно с модифицированными межнуклеозидными связями, такими как фосфотиоат.

**[285]** Будет признано, что при ссылке на конкретный мотив нуклеотидной последовательности или нуклеотидную последовательность, которая состоит только из нуклеотидов, олигомеры по настоящему изобретению, которые определяются этой последовательностью, могут содержать соответствующий аналог нуклеотида вместо одного или нескольких нуклеотидов, присутствующих в указанной последовательности, таких как LNA звенья или другие аналоги нуклеотидов, которые повышают стабильность дуплекса/ $T_m$  олигомера/целевой дуплекс (т.е. аналоги нуклеотидов, повышающие аффинность).

**[286] Анализ T<sub>m</sub>:** Дуплексы олигонуклеотида и целевой РНК (РО) разбавляют до 3 мМ в 500 мл воды, не содержащей РНКазы, и смешивают с 500 мл 2х T<sub>m</sub>-буфера (200 мМ NaCl, 0,2 мМ ЭДТА, 20 мМ фосфата натрия, уровень рН 7,0). Раствор нагревают до 95°C в течение 3 мин, а затем оставляют отжигаться при комнатной температуре в течение 30 мин. Температуры плавления дуплекса (T<sub>m</sub>) измеряют на спектрофотометре Lambda 40 UV/VIS, оборудованном устройством для программирования температуры на Пельтье РТР6 с использованием программного обеспечения PE Templab (Perkin Elmer). Температуру повышают от около 20 °С до около 95 °С, а затем снижают до около 25 °С, регистрируя поглощение при 260 нм. Первая производная и локальные максимумы плавления и отжига используются для оценки T<sub>m</sub> дуплекса.

**[287]** В некоторых аспектах, любые несоответствия между последовательностью нуклеотидов олигомера и целевой последовательностью обнаруживаются в областях за пределами усиливающих аффинность аналогов нуклеотидов, таких как область Y', как указано в разделе «Конструкция Гэпмера», и/или в положении с немодифицированными, такими как нуклеотиды ДНК, в олигонуклеотиде и/или в областях, которые находятся на 5' или 3' от непрерывной нуклеотидной последовательности.

## **II.e LNA**

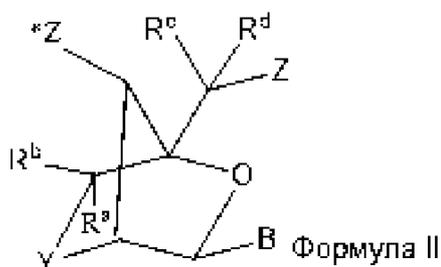
**[288]** В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению (например, АСО) содержит по меньшей мере одно звено LNA. Термины «замкнутая нуклеиновая кислота» и «LNA» относятся к любому аналогу бициклического нуклеозида, который содержит мостик между 2'- и 4'-положениями в рибозном кольце, т.е. аналогу бициклического нуклеотида от 2' к 4'. LNA в литературе иногда называют BNA (мостиговая нуклеиновая кислота или бициклическая нуклеиновая кислота), и эти два термина могут использоваться взаимозаменяемо. Термин LNA обычно относится к мономеру LNA. Термин «олигонуклеотид LNA» относится к олигонуклеотиду (например, АСО, такому как гэпмер), содержащему один или несколько таких аналогов бициклических нуклеотидов. В некоторых аспектах, аналоги бициклических нуклеозидов представляют собой нуклеотиды LNA, и поэтому эти термины могут использоваться взаимозаменяемо. В таких аспектах оба характеризуются наличием линкерной группы (такой как мостик) между C2' и C4' кольца рибозного сахара.

**[289]** В некоторых аспектах, антисмысловый олигонуклеотид по настоящему изобретению может содержать как бета-D-окси-LNA, так и одно или более из следующих

звеньев LNA: тио-LNA, amino-LNA, окси-LNA, 5'-метил-LNA и/или ENA либо в бета-D-, либо в альфа-L-конфигурации, либо в их комбинациях.

**[290]** В некоторых аспектах, все цитозинового звенья LNA представляют собой 5'-метилцитозин. В некоторых аспектах, по меньшей мере один аналог нуклеозида, присутствующий в первой области (X'), представляет собой аналог бициклического нуклеозида. В некоторых аспектах, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 аналогов нуклеозидов, присутствующих в первой области (X'), представляют собой бициклические аналоги нуклеозидов. Таким образом, в некоторых аспектах, все нуклеозиды в олигонуклеотиде по настоящему изобретению, за исключением нуклеозидов ДНК и/или РНК области Y', представляют собой аналоги нуклеозидов с модифицированным сахаром, например, бициклические аналоги нуклеозидов, такие как LNA (например, бета-D-X-LNA или альфа-L-X-LNA, где X представляет собой окси, amino или тио), другие LNA, раскрытые в настоящем документе, включая, помимо прочего, (R/S) cET, cMOE или 5'-Me-LNA или любую их комбинацию.

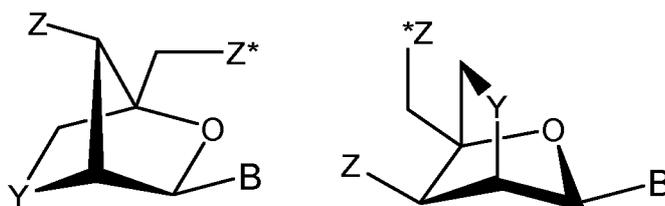
**[291]** В некоторых аспектах, LNA, используемый в олигонуклеотиде по настоящему изобретению, имеет структуру общей формулы II:



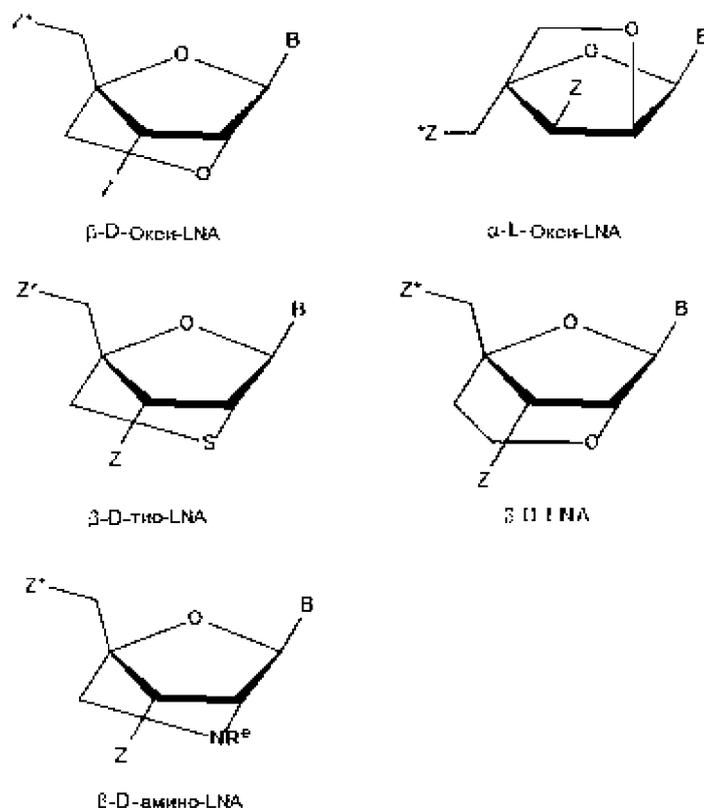
где Y выбран из группы, состоящей из -O-, -CH<sub>2</sub>O-, -S-, -NH-, N(R<sup>e</sup>) и/или -CH<sub>2</sub>-; Z и Z\* независимо выбраны из межнуклеозидной связи, RN, концевой группы или защитной группы; В представляет собой фрагмент природного или не природного нуклеотидного основания (нуклеооснование), а RN выбран из водорода и C1-4-алкила; R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup>, R<sup>d</sup> и R<sup>e</sup> необязательно независимо выбирают из группы, состоящей из водорода, необязательно замещенного C1-12-алкила, необязательно замещенного C2-12-алкенила, необязательно замещенного C2-12-алкинила, гидрокси, C1-12-алкокси, C2-12-алкоксиалкила, C2-12-алкенилокси, карбокси, C1-12-алкоксикарбонила, C1-12-алкилкарбонила, формила, арила, арилоксикарбонила, арилокси, арилкарбонила, гетероарила, гетероарилоксикарбонила, гетероарилокси, гетероарилкарбонила, amino, моно- и ди(C1-6-алкил)амино, карбамоила,

моно- и ди(С1-6-алкил)-аминокарбонила, amino-С1-6-алкил-аминокарбонила, моно- и ди (С1-6-алкил)амино-С1-6-алкиламинокарбонила, С1-6-алкилкарбониламино, карбамидо, С1-6-алканоилокси, сульфоно, С1-6-алкилсульфонилокси, нитро, азидо, сульфанила, С1-6-алкилтио, галогена, интеркаляторов ДНК, фотохимически активных групп, термохимически активных групп, хелатирующих групп, репортерных групп и лигандов, где арил и гетероарил могут быть необязательно замещены и где два геминальных заместителя  $R^a$  и  $R^b$  вместе могут обозначать необязательно замещенный метилен ( $=CH_2$ ); и  $RH$  выбран из водорода и С1-4-алкила.

[292] В некоторых аспектах,  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^d$  и  $R^e$  необязательно независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и С1-6 алкила, такого как метил. Для всех хиральных центров асимметрические группы могут быть обнаружены либо в ориентации  $R$ , либо в  $S$ , например, два типичных стереохимических изомера включают изоформы бета-D и альфа-L, которые можно проиллюстрировать следующим образом:



[293] Конкретные примерные звенья LNA показаны ниже:



[294] Термин «тио-LNA» включает замкнутый нуклеотид, в котором Y в приведенной выше общей формуле выбран из S или -CH<sub>2</sub>-S-. Тио-LNA может быть как в бета-D, так и в альфа-L-конфигурации.

[295] Термин «амино-LNA» включает замкнутый нуклеотид, в котором Y в приведенной выше общей формуле выбран из -N(H)-, N(R)-, CH<sub>2</sub>-N(H)- и -CH<sub>2</sub>-N(R)-, где R выбран из водорода и C1-4-алкила. Амино-LNA может быть как в бета-D, так и в альфа-L-конфигурации.

[296] Термин «окси-LNA» включает замкнутый нуклеотид, в котором Y в приведенной выше общей формуле представляет собой -O-. Окси-LNA может быть как в бета-D, так и в альфа-L-конфигурации.

[297] Термин «ENA» включает замкнутый нуклеотид, в котором Y в приведенной выше общей формуле представляет собой -CH<sub>2</sub>-O- (где атом кислорода -CH<sub>2</sub>-O- присоединен к 2'-положению относительно основания B). R<sup>e</sup> представляет собой водород или метил.

[298] В некоторых иллюстративных аспектах LNA выбран из бета-D-окси-LNA, альфа-L-окси-LNA, бета-D-амино-LNA и бета-D-тио-LNA, в частности, бета-D-окси-LNA.

[299] Используемый в настоящем документе термин «бициклические нуклеозиды» относится к модифицированным нуклеозидам, содержащим фрагмент бициклического сахара. Примеры бициклических нуклеозидов включают, без ограничения, нуклеозиды,

содержащие мостик между 4'- и 2'-атомами рибозильного кольца. В некоторых аспектах, соединения, предложенные в настоящем документе, включают один или несколько бициклических нуклеозидов, в которых мостик содержит 4'-2'-бициклический нуклеозид. Примеры таких 4'-2'-бициклических нуклеозидов включают, но не ограничиваются ими, одну из формул: 4'-(CH<sub>2</sub>)-O-2'(LNA); 4'-(CH<sub>2</sub>)-S-2'; 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2' (ENA); 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2' и 4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2\* и их аналоги (см. патент США № 7399845, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки); 4'-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)-O-2' и их аналоги (см. публикацию PCT WO 2009/006478, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки); 4'-CH<sub>2</sub>-N(OCH<sub>3</sub>)-2' и его аналоги (см. публикацию PCT WO 2008/150729, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки); 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-2' (см. публикацию заявки на патент США US 2004/0171570, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки); 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C1-C10 алкил или защитную группу (см. патент США № 7427672, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки); 4'-CH<sub>2</sub>-C(H)(CH<sub>3</sub>)-2' (см. Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74:118-134, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки); и 4'-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-2' и его аналоги (см. публикацию PCT WO 2008/154401, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки). Также см., например: Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4:455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54:3607-3630; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97:5633-5638; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8:2219-2222; Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63:10035-10039; Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc, 2007, 129:8362-8379; Elayadi et al., Curr. Opinion Invens. Drugs, 2001, 2:558-561; Braasch et al., Chem. Biol, 2001, 8:1-7; Oram et al, Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3:239-243; патенты США №№ 6670461, 7053207, 6268490, 6770748, 6794499, 7034133, 6525191, 7399845; опубликованные публикации PCT WO2004/106356, WO94/14226, WO2005/021570 и WO2007/134181; опубликованные заявки на патент США US2004/0171570, US2007/0287831 и US2008/0039618; и заявка на патент США №№ 12/129,154, 60/989,574, 61/026,995, 61/026,998, 61/056,564, 61/086,231, 61/097,787 и 61/099,844; и международные заявки PCT №№ PCT/US2008/064591, PCT/US2008/066154 и PCT/US2008/068922, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

**[300]** Каждый из указанных выше бициклических нуклеозидов может быть получен с одной или несколькими стереохимическими конфигурациями сахаров, включая, например, α-L-рибофуранозу и бета-D-рибофуранозу (см., например, публикацию PCT

WO 99/14226). В некоторых аспектах, бициклические сахарные фрагменты нуклеозидов LNA включают, но не ограничиваются ими, соединения, имеющие по меньшей мере один мостик между 4'- и 2'-положением пентофуранозильного сахарного фрагмента, где такие мостики независимо содержат 1 или от 2 до 4 связанных группы, независимо выбранные из [C(R<sup>a</sup>)XR<sup>b</sup>]-, -C(R<sup>a</sup>)=C(R<sup>b</sup>)-, -C(R<sup>a</sup>)=N-, -C(=NR<sup>a</sup>)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>-, -S(=O)<sub>x</sub>- и -N(R<sup>a</sup>)-; где: x равен 0, 1 или 2; n равен 1, 2, 3 или 4; каждый R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> независимо представляет собой H, защитную группу, гидроксил, C1-C12 алкил, замещенный C1-C12 алкил, C2-C12 алкенил, замещенный C2-C12 алкенил, C2-C12 алкинил, замещенный C2-C12 алкинил, C5-C20 арил, замещенный C5-C20 арил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, гетероарил, замещенный гетероарил, C5-C7 алициклический радикал, замещенный C5-C7 алициклический радикал, галоген, OJ1, NJ1J2, SJ1, N3, COOJ1, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, CN, сульфонил (S(=O)<sub>2</sub>-J1) или сульфоксил (S(=O)-J1), где каждый J1 и J2 независимо представляет собой H, C1- C6 алкил, замещенный C1-C12 алкил, C2-C12 алкенил, замещенный C2-C12 алкенил, C2-C12 алкинил, замещенный C2-C12 алкинил, C5-C20 арил, замещенный C5-C20 арил, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, радикал гетероцикла, замещенный радикал гетероцикла, C1- C12 аминоалкил, замещенный C1-C12 аминоалкил или защитная группа.

**[301]** В некоторых аспектах, мостик бициклического сахарного фрагмента представляет собой -[C(R<sup>a</sup>)(R<sup>b</sup>)]<sub>n</sub>-, -[C(R<sup>a</sup>)(R<sup>b</sup>)]<sub>n</sub>-O-, -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-N(R)-O- или -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-O-N(R)-. В некоторых аспектах, мостик представляет собой 4'-CH<sub>2</sub>-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-2', 4'-CH<sub>2</sub>-O-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2', 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(R)-2' и 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2', где каждый R независимо представляет собой H, защитную группу или C1-C12 алкил.

**[302]** В некоторых аспектах, бициклические нуклеозиды дополнительно определяются изомерной конфигурацией. Например, нуклеозид, содержащий 4'-2' метилен-оксимостик, может иметь конфигурацию α-L или конфигурацию β-D. Ранее α-L-метиленокси (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA были включены в антисмысловые олигонуклеотиды, которые проявляли антисмысловую активность. См. Frieden et al. (2003) *Nucleic Acids Research* 21:6365-6372).

**[303]** В некоторых аспектах, бициклические нуклеозиды включают, но не ограничиваются ими,

- (A) α-L-метиленокси (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA,
- (B) β-D-метиленокси (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA,
- (C) Этиленокси (4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2') BNA,
- (D) Аминоокси (4'-CH<sub>2</sub>-O-N(R)-2') BNA,
- (E) Оксиамино (4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2') BNA,

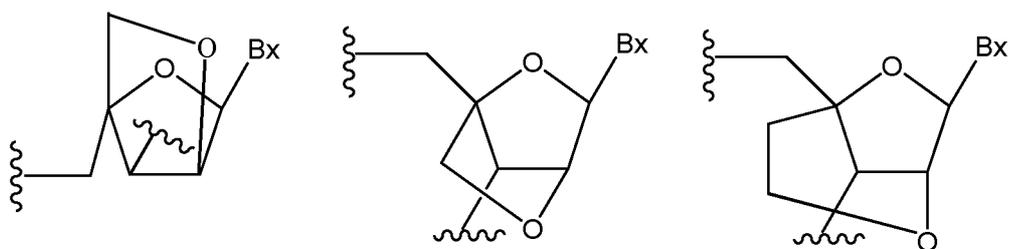
(F) Метил(метиленокси)(4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2') BNA,

(G) Метилен-тио (4'-CH<sub>2</sub>-S-2') BNA,

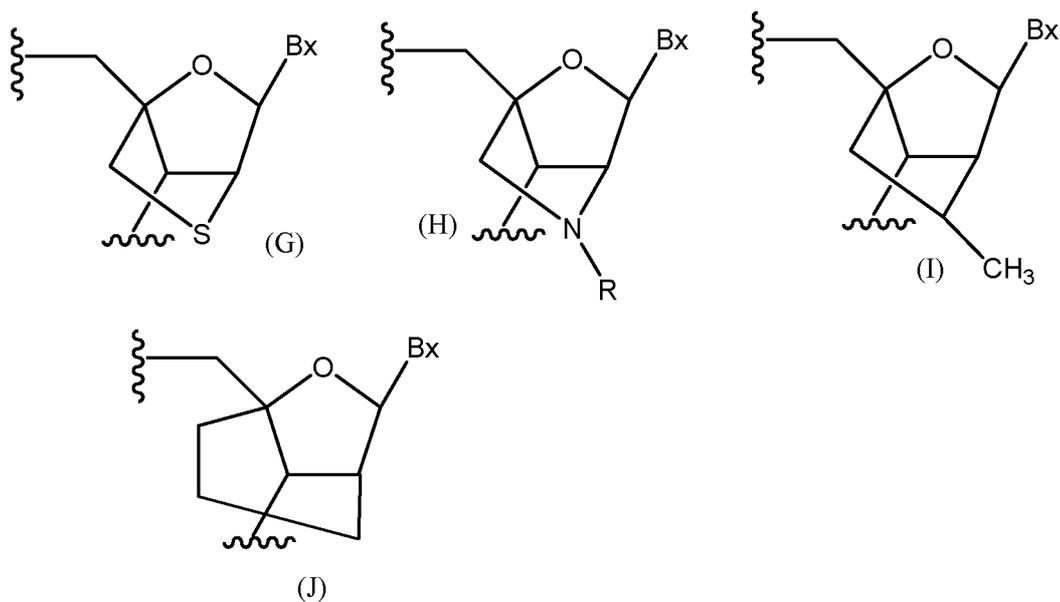
(H) Метилен-амино (4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-2') BNA,

(I) Метилкарбоциклический (4'-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-2') BNA, и

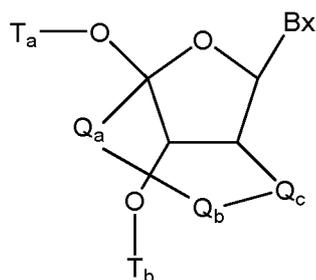
(J) Пропиленкарбоциклический (4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-2') BNA, как показано ниже.



где Bx являются основаниями и R представляет собой, независимо, H, защитную группу или C1-C2 алкил.



**[304]** В некоторых аспектах, бициклический нуклеозид определяется приведенной ниже формулой:



в которой:

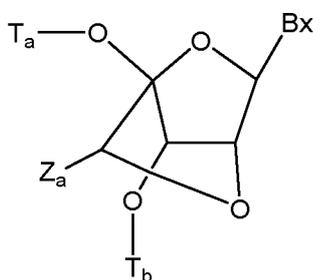
Vx представляет собой фрагмент гетероциклического основания;

-Qa-Qb-Qc представляет собой -CH<sub>2</sub>-N(Rc)-CH<sub>2</sub>-, -C(=O)-N(Rc)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-N(Rc)-, -CH<sub>2</sub>-N(Rc)- O- или -N(Rc)-O-CH<sub>2</sub>;

Rc представляет собой C1-C12 алкил или аминозащитную группу; и,

каждый из Ta и Tb независимо представляет собой H, гидроксильную защитную группу, группу конъюгата, группу реакционноспособного фосфора, фрагмент фосфора или ковалентное присоединение к среде носителя.

**[305]** В некоторых аспектах, бициклический нуклеозид определяется приведенной ниже формулой:



в которой:

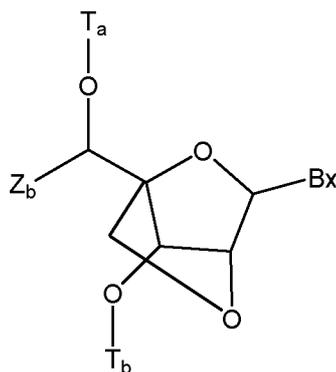
Vx представляет собой фрагмент гетероциклического основания;

Ta и Tb, каждый независимо, представляет собой H, гидроксильную защитную группу, группу конъюгата, реакционноспособную группу фосфора, фрагмент фосфора или ковалентное присоединение к среде носителя; и,

Za представляет собой C1-C6 алкил, C2-C6 алкенил, C2-C6 алкинил, замещенный C1-C6 алкил, замещенный C2-C6 алкенил, замещенный C2-C6 алкинил, ацил, замещенный ацил, замещенный амид, тиол или замещенный тио.

**[306]** В некоторых аспектах, каждая из замещенных групп независимо моно- или полизамещена замещающими группами, независимо выбранными из галогена, оксо, гидроксила, OJc, NJd, SJc, N<sub>3</sub>, OC(=X)Jc и NJeC(=X)NJcJd, где каждый Jc, Jd и Je независимо представляет собой H, C1-C6 алкил или замещенный C1-C6 алкил, а X представляет собой O или NJc.

**[307]** В некоторых аспектах, бициклический нуклеозид определяется приведенной ниже формулой:



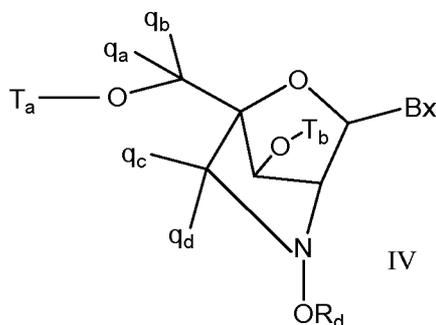
где:

Bx представляет собой фрагмент гетероциклического основания;

Ta и Tb, каждый независимо, представляет собой H, гидроксильную защитную группу, группу конъюгата, реакциюноспособную группу фосфора, фрагмент фосфора или ковалентное присоединение к среде носителя; и,

Rd представляет собой C1-C6 алкил, C2-C6 алкенил, C2-C6 алкинил, замещенный C1-C6 алкил, замещенный C2-C6 алкенил, замещенный C2-C6 алкинил или замещенный ацил (C(=O)-).

**[308]** В некоторых аспектах, бициклический нуклеозид определяется приведенной ниже формулой:



где:

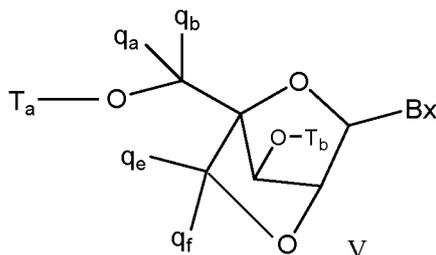
Bx представляет собой фрагмент гетероциклического основания;

каждый из Ta и Tb независимо представляет собой H, гидроксильную защитную группу, группу конъюгата, реакциюноспособную группу фосфора, фрагмент фосфора или ковалентное присоединение к среде носителя;

Rd представляет собой C1-C6 алкил, замещенный C1-C6 алкил, C2-C6 алкенил, замещенный C2-C6 алкенил, C2-C6 алкинил, замещенный C2-C6 алкинил;

каждый qb, qc и qd независимо представляет собой H, галоген, C-C6 алкил, замещенный C1-C6 алкил, C2-C6 алкенил, замещенный C2-C6 алкенил, C2-C6 алкинил или замещенный C2-C6 алкинил, C1-C6-алкоксил, замещенный C1-C6-алкоксил, ацил, замещенный ацил, C1-C6-аминоалкил или замещенный C1-C6-аминоалкил;

**[309]** В некоторых аспектах, бициклический нуклеозид определяется приведенной ниже формулой:



где:

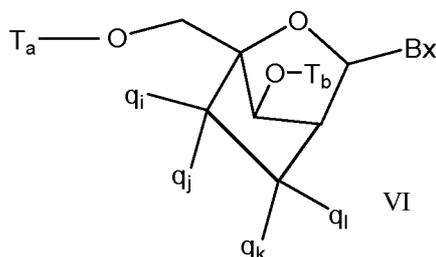
Bx представляет собой фрагмент гетероциклического основания;

Ta и Tb, каждый независимо, представляет собой H, гидроксильную защитную группу, группу конъюгата, реакционноспособную группу фосфора, фрагмент фосфора или ковалентное присоединение к среде носителя;

каждый qa, qb, qc и qf независимо представляет собой H, галоген, C1-C12 алкил, замещенный C1-C12 алкил, C2-C12 алкенил, замещенный C2-C12 алкенил, C2-C12 алкинил, замещенный C2-C12 алкинил, C1-C12-алкокси, замещенный C2-C12-алкокси, OJj, SJj, SOJj, SO<sub>2</sub>Jj, NJjJk, N<sub>3</sub>, CN, C(=O)OJj, C(=O)NJj Jk, C(=O)Jj, O-C(=O)NJj Jk, N(H)C(=NH)NJj Jk, N(H)C(=O)NJj Jk или (H)C(=S)NJj Jk;

или qe и qf вместе представляют собой =C(qg)(qh), где qg и qh каждый независимо представляет собой H, галоген, C1-C12 алкил или замещенный C1-C12 алкил.

**[310]** В некоторых аспектах, бициклический нуклеозид определяется приведенной ниже формулой:



где:

Bx представляет собой фрагмент гетероциклического основания;

Ta и Tb, каждый независимо, представляет собой H, гидроксильную защитную группу, группу конъюгата, реакционноспособную группу фосфора, фрагмент фосфора или ковалентное присоединение к среде носителя; каждый qj, qj, qk и ql независимо представляет собой H, галоген, C1-C12 алкил, замещенный C1-C12 алкил, C2-C12 алкенил, замещенный C2-C12 алкенил, C2-C12 алкинил, замещенный C2-C12 алкинил, C1

-C12-алкокси, замещенный C2-C12-алкокси, OJ, SJ, SOJ, SO<sub>2</sub>J, NJJk, N<sub>3</sub>, CN, C(=O)OJ, C(=O)NJJk, C(=O)J, O-C(=O) NJJk, N(H)C(=NH)NJJk, N(H)C(=O)NJJk или (H)C(=S)NJJk;

и q<sub>i</sub> и q<sub>j</sub> или q<sub>l</sub> и q<sub>k</sub> вместе представляют собой =C(qg)(qh), где qg и qh каждый независимо представляет собой H, галоген, C1-C12 алкил или замещенный C1-C6 алкил.

**[311]** Один карбоциклический бициклический нуклеозид, имеющий мостик 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-2', и аналог алкенила, мостик 4'-CH=CH-CH<sub>2</sub>-2', были описаны Freier et al. (1997) *Nucleic Acids. Research* 25:4429-4443 и Albaek et al (2006) *J. Org. Chem.* 71:7731-77 '40.

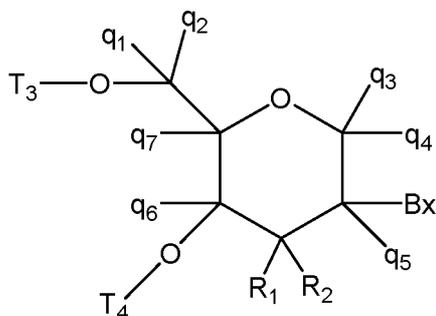
**[312]** Используемый в настоящем документе термин «4'-2'-бициклический нуклеозид» или «4' до 2'-бициклический нуклеозид» относится к бициклическому нуклеозиду, содержащему фуранозное кольцо, содержащее мостик, соединяющий 2'-атом углерода и 4'-атом углерода. Используемый в настоящем документе термин «моноциклические нуклеозиды» относится к нуклеозидам, содержащим модифицированные фрагменты сахара, которые не являются бициклическими фрагментами сахара. В некоторых аспектах, сахарная часть или аналог сахарной части нуклеозида может быть модифицирован или замещен в любом положении. Используемый в настоящем документе термин «2'-модифицированный сахар» означает фуранозильный сахар, модифицированный во 2'-положении. В некоторых аспектах, такие модификации включают заместители, выбранные из: галогенида, включая, помимо прочего, замещенный и незамещенный алкокси, замещенный и незамещенный тиоалкил, замещенный и незамещенный аминоалкил, замещенный и незамещенный алкил, замещенный и незамещенный аллил, а также замещенный и незамещенный алкинил. В некоторых аспектах, 2'-модификации выбирают из заместителей, включая, но не ограничиваясь ими: O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>C(=O)N(H)CH<sub>3</sub> и O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, где n и m равны от 1 до около 10.

**[313]** Другие 2'-заместители также могут быть выбраны из: C1-C12 алкила; замещенного алкила; алкенила; алкинила; алкарила; аралкила; O-алкарила или O-аралкила; SH; SCH<sub>3</sub>; OCN; Cl; Br; CN; CF<sub>3</sub>; OCF<sub>3</sub>; SOCH<sub>3</sub>; SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; ONO<sub>2</sub>; NO<sub>2</sub>; N<sub>3</sub>; NH<sub>2</sub>; гетероциклоалкила; гетероциклоалкарила; аминоалкиламино; полиалкиламино; замещенного силила; R; отщепляемой группы; репортерной группы; интеркалятора; группы для улучшения фармакокинетических свойств; и группы для улучшения фармакодинамических свойств антисмыслового соединения и других заместителей, обладающих подобными свойствами.

**[314]** В некоторых аспектах, модифицированные нуклеозиды содержат боковую цепь 2'-МОЕ. Такое замещение 2'-МОЕ было описано как имеющее улучшенную аффинность

связывания по сравнению с немодифицированными нуклеозидами и с другими модифицированными нуклеозидами, такими как 2'-О-метил, О-пропил и О-аминопропил. Олигонуклеотиды, имеющие заместитель 2'-МОЕ, являются мощными антисмысловыми ингибиторами экспрессии генов для использования *in vivo*.

**[315]** Используемый в настоящем документе термин «модифицированный тетрагидропирановый нуклеозид» или «модифицированный ТНР-нуклеозид» означает нуклеозид, содержащий шестичленный тетрагидропирановый «сахар», замещенный пентофуранозильным остатком в нормальных нуклеозидах (заменитель сахара). Модифицированные нуклеозиды ТНР включают, но не ограничиваются ими, те, что в данной области называется гекситолнуклеиновой кислотой (HNA), алтритолнуклеиновой кислотой (ANA), маннитолнуклеиновой кислотой (MNA), фтор-HNA (F-HNA) или теми соединения, которые определяются приведенной ниже формулой:



в которой:

Bx представляет собой фрагмент гетероциклического основания;

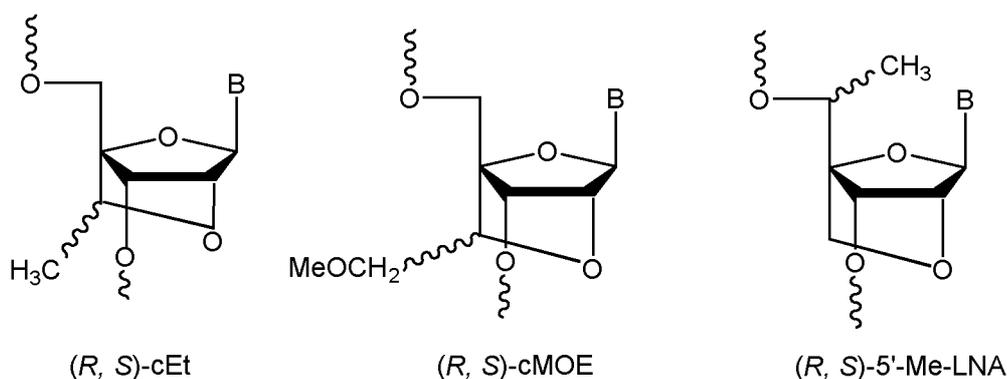
каждый из T3 и T4 независимо представляет собой межнуклеозидную связывающую группу, связывающую аналог тетрагидропиранового нуклеозида с антисмысловым соединением, или один из T3 и T4 представляет собой межнуклеозидную связывающую группу, связывающую аналог тетрагидропиранового нуклеозида с антисмысловым соединением, а другой из T3 и T4 представляет собой H, гидроксильную защитную группу, связанную группу конъюгата или 5'- или 3'-концевую группу;

каждый из q1, q2, q3, q4, q5, q6 и q7 независимо представляет собой H, C1-C6 алкил, замещенный C1-C6 алкил, C2-C6 алкенил, замещенный C2-C6 алкенил, C2-C6 алкинил или замещенный C2-C6 алкинил; и один из R1 и R2 представляет собой водород, а другой выбран из галогена, замещенного или незамещенного алкокси, NJ, J2, SJ, N3, OC(=X)J1, OC(=X)NJ1J2, NJ3C(=X)NJ1J2 и CN, где X представляет собой O, S или NJ1, и каждый J1, J2 и J3 независимо представляет собой H или C1-C6 алкил. В некоторых аспектах, предлагаются модифицированные нуклеозиды ТНР формулы, приведенной выше, где

каждый из  $qm$ ,  $qn$ ,  $qr$ ,  $qg$ ,  $qs$ ,  $qt$  и  $qu$  представляет собой H. В некоторых аспектах, по меньшей мере один из  $qm$ ,  $qn$ ,  $qr$ ,  $qg$ ,  $qs$ ,  $qt$  и  $qu$  отличен от H. В некоторых аспектах, по меньшей мере один из  $qm$ ,  $qn$ ,  $qr$ ,  $qg$ ,  $qs$ ,  $qt$  и  $qu$  представляет собой метил. В некоторых аспектах, предлагаются нуклеозиды ТНР приведенной выше формулы, где один из  $R_1$  и  $R_2$  представляет собой F. В некоторых аспектах,  $R_1$  представляет собой фтор, а  $R_2$  представляет собой H,  $R_1$  представляет собой метокси, и  $R_2$  представляет собой H, или  $R_1$  представляет собой метоксиэтокси, а  $R_2$  представляет собой H.

**[316]** Используемый в настоящем документе термин «2'-модифицированный» или «2'-замещенный» относится к нуклеозиду, содержащему сахар, содержащий заместитель во 2'-положении, отличный от H или OH. 2'-модифицированные нуклеозиды включают, но не ограничиваются ими, нуклеозиды с немостиковыми 2'-заместителями, такими как аллил, amino, азидо, тио, O-аллил, O-C1-C10 алкил,  $-OCF_3$ ,  $O-(CH_2)_2-O-CH_3$ , 2'- $O(CH_2)_2SCH_3$ ,  $O-(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$  или  $O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$ , где каждый  $R_m$  и  $R_n$  независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный C1-C10 алкил. 2'-модифицированные нуклеозиды могут дополнительно содержать другие модификации, например, в других положениях сахара и/или нуклеотидного основания.

**[317]** В некоторых аспектах, звенья LNA имеют структуру, выбранную из следующей группы:



**[318]** Включение в олигомер аналогов нуклеотидов, усиливающих аффинность, таких как LNA или 2'-замещенные сахара, может позволить уменьшить размер специфически связывающегося олигомера, а также может уменьшить верхний предел размера олигомера. до того, как произойдет неспецифическое или aberrantное связывание.

## II.f Рекрутирование РНКазы

**[319]** Олигомерное соединение по настоящему изобретению может действовать посредством не опосредованной РНКазой деградации целевой мРНК, например, за счет

стерических затруднений трансляции или других способов. В некоторых аспектах, олигомеры по настоящему изобретению способны рекрутировать эндорибонуклеазу (РНКазу), такую как РНКазы Н. В некоторых олигомерах, таких как область А или непрерывная нуклеотидная последовательность, содержит область по меньшей мере из 4, например, по меньшей мере 5, например, по меньшей мере 6, например, по меньшей мере 7 последовательных нуклеотидных звеньев, таких как по меньшей мере 8 или по меньшей мере 9 последовательных нуклеотидных звеньев (остатков), включая 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 последовательных нуклеотидов, которые при образовании дуплекса с комплементарной целевой РНК способны рекрутировать РНКазу (например, ДНК звенья). Непрерывная последовательность, которая способна рекрутировать РНКазу, может быть областью Y', как указано в контексте гЭПМЕРА, как описано в настоящем документе. В некоторых аспектах, размер непрерывной последовательности, способной рекрутировать РНКазу, такой как область Y', может быть выше, например, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидных звеньев.

**[320]** Олигомер считается способным рекрутировать РНКазу Н, если при наличии комплементарной целевой РНК его начальная скорость, измеренная в пмоль/л/мин, составляет по меньшей мере 1 %, например, по меньшей мере 5 %, например, по меньшей мере 10% или более 20% от начальной скорости, определенной с использованием только ДНК-олигонуклеотида, имеющего ту же последовательность оснований, но содержащего только мономеры ДНК, без 2'-замен, с тиофосфатными связывающими группами между всеми мономерами в олигонуклеотиде, используя методологию, представленную, например, в EP 1222309.

**[321]** В некоторых аспектах, олигомер считается по существу неспособным рекрутировать РНКазу Н, если при наличии комплементарной целевой РНК и РНКазы Н начальная скорость РНКазы Н, измеренная в пмоль/л/мин, составляет менее 1%, например менее 5%, например, менее 10% или менее 20% от начальной скорости, определенной с использованием эквивалентного олигонуклеотида только ДНК, без 2'-замен, с тиофосфатными связывающими группами между всеми нуклеотидами в олигонуклеотиде, используя методологию, представленную, например, в EP 1222309.

**[322]** В других аспектах олигомер считается способным рекрутировать РНКазу Н, если при наличии комплементарной целевой РНК и РНКазы Н начальная скорость РНКазы Н, измеренная в пмоль/л/мин, составляет по меньшей мере 20%, например, по меньшей мере 40 %, например, по меньшей мере 60 %, например, по меньшей мере 80 % исходной скорости, определенной с использованием эквивалентного олигонуклеотида только ДНК,

без 2'-замен, с тиофосфатными связывающими группами между всеми нуклеотидами в олигонуклеотиде, используя методологию, представленную, например, в EP 1222309.

**[323]** Как правило, область олигомера, которая образует последовательные нуклеотидные звенья, которые при образовании в дуплексе с комплементарной целевой РНК способны рекрутировать РНКазу, состоит из нуклеотидных звеньев, которые образуют ДНК/РНК-подобный дуплекс с целевой РНК. Олигомер по настоящему изобретению, такой как первая область, может содержать нуклеотидную последовательность, которая включает как нуклеотиды, так и аналоги нуклеотидов, и находится в форме гэпмера LNA.

### **II.g Структура гэпмера**

**[324]** В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению представляет собой гэпмер LNA. Олигомер гэпмера представляет собой олигомер, который содержит непрерывный участок нуклеотидов, способный рекрутировать РНКазу, такую как РНКазу H, такой как участок по меньшей мере из 6 или 7 нуклеотидов ДНК, именуемый в настоящем документе как область Y' (Y'), где область Y' граничит с 5' и 3' областями аналогов нуклеотидов, усиливающих аффинность, например, от 1-6 аналогов нуклеотидов 5' и 3' к непрерывному участку нуклеотидов, который способен рекрутировать РНКазу, - эти области обозначаются как области X' (X') и Z' (Z'), соответственно. Области X' и Z' также можно назвать крыльями гэпмера. Примеры гэпмеров раскрыты, например, в WO 2004/046160, WO 2008/113832 и WO 2007/146511.

**[325]** В некоторых аспектах, мономеры, которые способны рекрутировать РНКазу, выбирают из группы, состоящей из мономеров ДНК, мономеров альфа-L-LNA, C4'-алкилированных мономеров ДНК и нуклеотидов UNA (несвязанная нуклеиновая кислота). UNA представляет собой незамкнутую нуклеиновую кислоту, обычно в которой удалена связь C2-C3 C-C рибозы с образованием незамкнутого «сахарного» остатка. В некоторых аспектах, гэпмер LNA содержит (поли)нуклеотидную последовательность формулы (5'-3'), X'-Y'-Z', где; область X' (X') (5'-область) включает или состоит из по меньшей мере одного аналога нуклеотида, такого как по меньшей мере одно звено LNA, например, из 1-6 аналогов нуклеотидов, таких как звенья LNA, и; область Y' (Y') включает или состоит из по меньшей мере четырех или по меньшей мере пяти последовательных нуклеотидов, которые способны рекрутировать РНКазу (при образовании в дуплексе с комплементарной молекулой РНК, такой как целевая мРНК), например нуклеотиды ДНК, и; область Z' (Z') (3'-область) включает или состоит из по меньшей мере одного аналога

нуклеотида, такого как по меньшей мере одно звено LNA, например, из 1-6 аналогов нуклеотидов, таких как звенья LNA.

**[326]** В некоторых аспектах, область X' состоит из 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аналогов нуклеотидов, таких как звенья LNA, например, из 2-5 аналогов нуклеотидов, таких как 2-5 звеньев LNA, таких как аналоги из 3 или 4 нуклеотидов, такие как 3 или 4 звена LNA; и/или область Z' состоит из 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аналогов нуклеотидов, таких как звенья LNA, такие как аналоги из 2-5 нуклеотидов, такие как 2-5 звеньев LNA, такие как аналоги из 3 или 4 нуклеотидов, такие как 3 или 4 звена LNA.

**[327]** В некоторых аспектах, Y' включает или состоит из 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 последовательных нуклеотидов, которые способны рекрутировать РНКазу, или из 4-12 или из 6-10, или из 7-9, например, 8 последовательных нуклеотидов, способных рекрутировать РНКазу. В некоторых аспектах, область Y' включает или состоит по меньшей мере из одного нуклеотидного звена ДНК, такого как 1-12 звеньев ДНК, предпочтительно из 4-12 звеньев ДНК, более предпочтительно из 6-10 звеньев ДНК, например, из 7-10 звеньев ДНК, наиболее предпочтительно 8, 9 или 10 звеньев ДНК. В некоторых аспектах, область X' состоит из 3 или 4 аналогов нуклеотидов, таких как LNA, область X' состоит из 7, 8, 9 или 10 звеньев ДНК, а область Z' состоит из 3 или 4 аналогов нуклеотидов, таких как LNA. К таким конструкциям относятся (X'-Y'-Z') 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 3-9-3, 3-9-4, 4-9-3, 3-8-3, 3-8-4, 4-8-3, 3-7-3, 3-7-4, 4-7-3. В некоторых аспектах, гэпмер представляет собой гэпмер 3-9-4. В некоторых аспектах, гэпмер представляет собой гэпмер 3-10-3.

**[328]** В некоторых аспектах, олигомер, например, область X', состоит из непрерывной нуклеотидной последовательности, состоящей в общей сложности из 10, 11, 12, 13 или 14 нуклеотидных звеньев, при этом непрерывная нуклеотидная последовательность содержит или имеет формулу (5'-3'), X'-Y'-Z' где; X' состоит из 1, 2 или 3 звеньев аналогов нуклеотидов, таких как звенья LNA; Y' состоит из 7, 8 или 9 смежных нуклеотидных звеньев, которые способны рекрутировать РНКазу при образовании в дуплексе с комплементарной молекулой РНК (такой как целевая мРНК); и Z' состоит из 1, 2 или 3 звеньев аналогов нуклеотидов, таких как звенья LNA.

**[329]** В некоторых аспектах, X' состоит из 1 звена LNA. В некоторых аспектах, X' состоит из 2 звеньев LNA. В некоторых аспектах, X' состоит из 3 звеньев LNA. В некоторых аспектах, Z' состоит из 1 звена LNA. В некоторых аспектах, Z' состоит из 2 звеньев LNA. В некоторых аспектах, Z' состоит из 3 звеньев LNA. В некоторых аспектах, Y' состоит из 7 нуклеотидных звеньев. В некоторых аспектах, Y' состоит из 8

нуклеотидных звеньев. В некоторых аспектах, Y' состоит из 9 нуклеотидных звеньев. В некоторых аспектах, область Y' состоит из 10 нуклеозидных мономеров. В некоторых аспектах, область Y' состоит или содержит 1-10 мономеров ДНК. В некоторых аспектах, Y' состоит из 1-9 звеньев ДНК, таких как 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 звеньев ДНК. В некоторых аспектах, Y' состоит из звеньев ДНК. В некоторых аспектах, Y' содержит по меньшей мере одно звено LNA, которое находится в альфа-L-конфигурации, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 звеньев LNA в альфа-L-конфигурации. В некоторых аспектах, Y' содержит по меньшей мере одно звено альфа-L-окси LNA или где все звенья LNA в альфа-L-конфигурации представляют собой звенья альфа-L-окси LNA. В некоторых аспектах, количество нуклеотидов, присутствующих в X'-Y'-Z', выбрано из группы, состоящей из (звеньев аналогов нуклеотидов - область Y' - звеньев аналогов нуклеотидов): 1-8-1, 1-8-2, 2-8-1, 2-8-2, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2, 4-8-1, 4-8-2, 1-8-4, 2-8-4, 1-9-1, 1-9-2, 2-9-1, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 1-9-3, 3-9-1, 4-9-1, 1-9-4 или; 1-10-1, 1-10-2, 2-10-1, 2-10-2, 1-10-3, 3-10-1, 2-10-3 или 3-10-2. В некоторых аспектах, количество нуклеотидов в X'-Y'-Z' выбрано из группы, состоящей из: 2-7-1, 1-7-2, 2-7-2, 3-7-3, 2-7-3, 3-7-2, 3-7-4 и 4-7-3.

**[330]** В некоторых аспектах, каждая из областей X' и Y' состоит из трех мономеров LNA, а область Y' состоит из 8, или 9, или 10 нуклеозидных мономеров, предпочтительно мономеров ДНК. В некоторых аспектах, X' и Z' состоят из двух звеньев LNA каждый, а Y' состоит из 8 или 9 нуклеотидных звеньев, предпочтительно звеньев ДНК. В некоторых аспектах, другие конструкции гэпмеров включают те, в которых области X' и/или Z' состоят из 3, 4, 5 или 6 аналогов нуклеозидов, таких как мономеры, содержащие сахар 2'-О-метоксиэтилрибозы (2'-МОЕ) или мономеры, содержащие сахар 2'-фтордезоксирибозу, а область Y' состоит из 8, 9, 10, 11 или 12 нуклеозидов, таких как мономеры ДНК, где области X'-Y'-Z' имеют 3-9-3, 3-10-3, 5-10-5 или 4-12-4 мономеры. Дополнительные конструкции гэпмеров раскрыты, например, в WO 2007/146511A2, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

**[331]** В некоторых аспектах, олигомер гэпмера по настоящему изобретению содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 40. В некоторых аспектах, олигомер гэпмера настоящего изобретения состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 40.

## **II.h Межнуклеозидные связи**

**[332]** В некоторых аспектах, нуклеозидные мономеры олигонуклеотидов по настоящему изобретению связаны друг с другом посредством межнуклеозидных связывающих групп.

Каждый мономер связан с соседним 3'-мономером через связывающую группу. Каждый нуклеотид также связан с соседним 3'-нуклеотидом через связывающую группу. В контексте настоящего изобретения 5'-мономер на конце олигомера не содержит 5'-связывающей группы, хотя он может содержать или не содержать 5'-концевую группу или связывающую группу для конъюгации.

**[333]** Термины «связывающая группа» или «межнуклеозидная связь» предназначены для обозначения группы, способной ковалентно связывать вместе два нуклеотида. Конкретные примеры включают фосфатные группы и фосфоротиоатные группы. Межнуклеозидная связь может использоваться взаимозаменяемо с межнуклеозидной связью.

**[334]** Пригодные межнуклеозидные связи включают связи, перечисленные, например, в WO 2007/031091, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых аспектах, помимо фосфодиэфирной(ых) связи(й) области В (если присутствует), межнуклеозидные связи могут быть модифицированы с их обычных фосфодиэфирных связей на более устойчивые к атаке нуклеаз, такие как фосфоротиоатная или боранофосфатная. Эти два вещества, расщепляемые РНКазой H, также допускают этот путь антисмыслового ингибирования при снижении экспрессии целевого гена.

**[335]** В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению содержит одну или несколько нуклеозидных связей, выбранных из группы, состоящей из фосфоротиоата, фосфородитиоата, боранофосфата, метилфосфоната, фосфорамидата или любой их комбинации. Можно использовать пригодные серосодержащие (S) межнуклеозидные связи, как предусмотрено в настоящем документе, например, фосфоротиоат, фосфодитиоат или их комбинации. Фосфоротиоатные межнуклеозидные связи также являются предпочтительными, особенно для первой области, например, в гЭпмерах, миксмерах, сплайсинг-переключающих олигомерах и тоталмерах.

**[336]** Термин «миксмер» относится к олигомерам, которые содержат как встречающиеся в природе, так и неприродные нуклеотиды, при этом, в отличие от гЭпмеров, хвостовых и головных, не существует непрерывной последовательности из более чем 5, а в некоторых аспектах, не более чем 4 последовательных, например, не более трех последовательных природных нуклеотидов, таких как звенья ДНК.

**[337]** Термин «тоталмер» относится к одноцепочечному олигомеру, который содержит только неприродные нуклеозиды, такие как аналоги нуклеозидов с модифицированным сахаром.

**[338]** Для гѣпмеров межнуклеозидные связи в олигомере могут быть, например, фосфоротиоатными или боранофосфатными, чтобы позволить РНКазе Н расщеплять целевую РНК. Фосфоротиоат является предпочтительным из-за повышенной устойчивости к нуклеазам и по другим причинам, таким как простота производства.

**[339]** В некоторых аспектах, за исключением фосфодиэфирной связи между первой и второй областью и, необязательно, внутри области В, остальные межнуклеозидные связи олигомера по настоящему изобретению, нуклеотиды и/или аналоги нуклеотидов связаны с каждым другим с помощью тиофосфатных групп.

**[340]** В некоторых аспектах, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или около 110% всех межнуклеозидных связей между нуклеозидами в первой области выбраны из группы, состоящей из фосфоротиоата, фосфородитиоата или боранофосфата. В некоторых аспектах, около 10%, около 15%, около 20%, около 25%, около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%. %, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95% или около 100% всех межнуклеозидных связей между нуклеозидами в первой области выбраны из группы, состоящей из тиофосфата, фосфородитиоата или боранофосфата.

**[341]** В некоторых аспектах, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или около 110% всех межнуклеозидных связей между нуклеозидами в первой области являются тиофосфатными. В некоторых аспектах, около 10%, около 15%, около 20%, около 25%, около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95% или около

100% всех межнуклеозидных связей между нуклеозидами в первой области являются тиофосфатными.

**[342]** В некоторых аспектах, олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит только одну фосфоротиоатную связь. В некоторых аспектах, олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит две фосфоротиоатные связи. В некоторых аспектах, олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит три фосфоротиоатные связи. В некоторых аспектах, олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит четыре фосфоротиоатные связи. В некоторых аспектах, олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит пять фосфоротиоатных связей. В некоторых аспектах, олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит шесть фосфоротиоатных связей. В некоторых аспектах, олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит семь фосфоротиоатных связей. В некоторых аспектах, олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит восемь фосфоротиоатных связей. В некоторых аспектах, олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит девять фосфоротиоатных связей. В некоторых аспектах, олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит 10 фосфоротиоатных связей. В некоторых аспектах, олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит 11 фосфоротиоатных связей. В некоторых аспектах, олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит 12 фосфоротиоатных связей. В некоторых аспектах, олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит 13 фосфоротиоатных связей. В некоторых аспектах, олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит 14 фосфоротиоатных связей. В некоторых аспектах, олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит 15 фосфоротиоатных связей. В некоторых аспектах, олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит 16 фосфоротиоатных связей. В некоторых аспектах, олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит 17 фосфоротиоатных связей. В некоторых аспектах, олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит 18 фосфоротиоатных связей. В некоторых аспектах, олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит 19 фосфоротиоатных связей. В некоторых аспектах, олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит 20 фосфоротиоатных связей. В некоторых аспектах, олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит 21 фосфоротиоатную связь.

**[343]** WO 09124238 относится к олигомерным соединениям, имеющим по меньшей мере один бициклический нуклеозид, присоединенный к 3'- или 5'-концу нейтральной межнуклеозидной связью. Таким образом, олигомер по настоящему изобретению может иметь по меньшей мере один бициклический нуклеозид, присоединенный к 3'- или 5'-

концу нейтральной межнуклеозидной связью, такой как один или несколько фосфотриэфирных, метилфосфонатных, ММІ, амид-3, формацеталей или тиоформацеталей. Остальные связи могут быть фосфоротиоатными.

### III. Конъюгаты олигонуклеотида

[344] В некоторых аспектах, конъюгаты антисмысловых олигонуклеотидов по настоящему изобретению, содержащие по меньшей мере один нуклеотидный или непонуклеотидный фрагмент (С), ковалентно присоединенный к указанному олигомеру (А), необязательно через линкерный участок, расположенный между смежной последовательностью олигомера и фрагмент конъюгата (В и/или Y).

[345] Репрезентативные фрагменты конъюгатов, которые использовались с олигонуклеотидами, могут включать липофильные молекулы (ароматические и неароматические), включая стероидные молекулы, белки (например, антитела, ферменты, белки сыворотки); пептиды; витамины (водорастворимые или жирорастворимые); полимеры (водорастворимые или жирорастворимые); малые молекулы, включая лекарства, токсины, репортерные молекулы и лиганды рецепторов; углеводные комплексы; комплексы, расщепляющие нуклеиновые кислоты; хелаторы металлов (например, порфирины, тексафирины, краун-эфиры и т.д.); интеркаляторы, включая гибридные фотонуклеазы/интеркаляторы; сшивающие агенты (например, фотоактивные, редокс-активные) и их комбинации и производные.

[346] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к конъюгату антисмыслового олигонуклеотида, содержащему

а. антисмысловой олигомер (А) длиной от 16 до 22 нуклеотидов, который содержит непрерывную последовательность из 16 нуклеотидов, комплементарных соответствующей длине SEQ ID NO: 31, и при этом указанный антисмысловой олигомер представляет собой гэпмер LNA, и

б. по меньшей мере один асиалогликопротеиновый рецептор, нацеленный на фрагмент конъюгата (С), ковалентно присоединенный к указанному олигомеру (А).

[347] В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению нацелен на печень, т. е. после системного введения соединение накапливается в клетках печени (таких как гепатоциты). Нацеливание на печень может быть значительно усилено добавлением фрагмента конъюгата (С). Однако для максимизации эффективности олигомера часто желательно, чтобы конъюгат (или нацеливающий фрагмент) был связан с олигомером посредством биорасщепляемого линкера (В), такого как нуклеотид-фосфатный линкер.

Следовательно, желательно использовать фрагмент конъюгата, которая увеличивает поглощение и активность в гепатоцитах. Повышение активности может быть связано с усиленным поглощением или может быть связано с усилением активности соединения в гепатоцитах. Соответственно, в настоящем изобретении также предложено олигомерное соединение в форме олигомера LNA, такого как гэпмер, или, например, антисмысловой олигомер LNA (который может называться в настоящем документе областью А), содержащий антисмысловой олигомер, необязательно биорасщепляемый линкер, такой как область В, и углеводный конъюгат (который можно обозначить как область С). Антисмысловой олигомер LNA может иметь длину от 7 до 30 нуклеозидов, например, от 8 до 26 нуклеозидов, и содержать по меньшей мере одно звено LNA (нуклеозид).

**[348]** В некоторых аспектах, конъюгат представляет собой или может содержать углевод или содержит углеводную группу. В некоторых аспектах, углевод выбирают из группы, состоящей из галактозы, лактозы, н-ацетилгалактозамина, маннозы и маннозо-6-фосфата. В некоторых аспектах, группа конъюгата представляет собой или может содержать маннозу или маннозо-6-фосфат. Углеводные конъюгаты можно использовать для усиления доставки или активности в ряде тканей, таких как печень и/или мышцы. В некоторых аспектах, конъюгат по настоящему изобретению содержит фрагмент конъюгата, нацеленный на асиалогликопротеиновый рецептор, в форме углеводного фрагмента, такого как фрагмент GalNAc (который может быть обозначен как область С). Углеводная часть может быть поливалентной, например, 2, 3, 4 или 4 идентичных или неидентичных углеводных фрагмента могут быть ковалентно присоединены к олигомеру, необязательно через линкер или линкеры (такие как область Y).

**[349]** В некоторых аспектах, углеводный фрагмент не является линейным углеводным полимером. Однако углеводный фрагмент может быть многовалентным, например, 2, 3, 4 или 4 идентичных или неидентичных углеводных фрагмента могут быть ковалентно присоединены к олигомеру, необязательно через линкер или линкеры.

### **III.a GalNAc фрагменты конъюгата**

**[350]** В настоящем изобретении предложен конъюгат, содержащий олигомер по настоящему изобретению и фрагмент конъюгата, нацеленный на рецептор асиалогликопротеина, такой как фрагмент GalNAc, который может образовывать часть дополнительной области (называемой областью С). В настоящем изобретении также предложен конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, содержащий

а. антисмысловой олигомер (А) длиной от 16 до 22 нуклеотидов, который содержит непрерывную последовательность из 16 нуклеотидов, комплементарных соответствующей длине SEQ ID NO: 31, и при этом указанный антисмысловой олигомер представляет собой гэтмер LNA, содержащий по меньшей мере одно звено LNA и

б. по меньшей мере один асиалогликопротеиновый рецептор, нацеленный на фрагмент конъюгата (С), ковалентно присоединенный к указанному олигомеру (А).

**[351]** В некоторых аспектах, фрагмент конъюгата (такой как третья область или область С) содержит фрагмент, нацеленный на асиалогликопротеиновый рецептор, выбранный из группы, состоящей из таких, как галактоза, галактозамин, N-формилгалактозамин, N-ацетилгалактозамин, N-пропионилгалактозамин, N-н-бутаноилгалактозамин и N-изобутаноилгалактозамин. В некоторых аспектах, конъюгат содержит кластер галактозы, такой как тример N-ацетилгалактозамина. В некоторых аспектах, фрагмент конъюгата содержит GalNAc (N-ацетилгалактозамин), такой как одновалентный, двухвалентный, трехвалентный или четырехвалентный GalNAc.

**[352]** Трехвалентные конъюгаты GalNAc можно использовать для нацеливания соединения на печень. Конъюгаты GalNAc использовались с метилфосфонатом и антисмысловыми олигонуклеотидами ПНК и кРНК. WO 2012/083046 раскрывает кРНК с фрагментами конъюгата GalNAc, которые содержат расщепляемые модуляторы фармакокинетики, которые подходят для использования в настоящем изобретении, предпочтительными модуляторами фармакокинетики являются гидрофобные группы C16, такие как пальмитоил, гексадец-8-еноил, олеил, (9E, 12E)-октадека-9,12-диеноил, диоктаноил и C16-C20 ацил. Расщепляемые фармакокинетические модуляторы '046 также могут представлять собой холестерин.

**[353]** «Направляющие фрагменты» (конъюгированные фрагменты) могут быть выбраны из группы, состоящей из: галактозы, галактозамина, N-формилгалактозамина, N-ацетилгалактозамина, N-пропионилгалактозамина, N-н-бутаноилгалактозамина, N-изобутаноилгалактозамина, кластера галактозы и тримера N-ацетилгалактозамина и может иметь фармакокинетический модулятор, выбранный из группы, состоящей из: гидрофобной группы, содержащей 16 или более атомов углерода, гидрофобной группы, содержащей 16-20 атомов углерода, пальмитоила, гексадец-8-еноила, олеила, (9E,12E)-октадека-9,12-диеноила, диоктаноила и C16-C20 ацила и холестерина. Некоторые кластеры GalNAc, раскрытые в '046, включают: (E)-гексадец-8-еноил (C16), олеил (C18), (9,E,12E)-октадека-9,12-диеноил (C18), октаноил (C8), додецеканоил (C12), ацил C-20, ацил C24, диоктаноил (2xС8). Нацеливающий фрагмент фармакокинетического

модулятора может быть связан с полинуклеотидом посредством физиологически лабильной связи или, например, дисульфидная связи или линкер ПЭГ. Настоящее раскрытие также относится к использованию фосфодиэфирных линкеров между олигомером и группой конъюгата (они обозначаются в настоящем документе как область В и соответственно расположены между олигомером LNA и группой углеводного конъюгата).

**[354]** Для нацеливания на гепатоциты в печени предпочтительным нацеливающим лигандом является кластер галактозы. Кластер галактозы включает молекулу, имеющую, например, содержащие от двух до четырех терминальных производных галактозы. В некоторых аспектах, производное галактозы представляет собой N-ацетилгалактозамин (GalNAc). Другие сахараиды, обладающие сродством к рецептору асиалогликопротеина, могут быть выбраны из списка, включающего: галактозамин, N-н-бутаноилгалактозамин и N-изобутаноилгалактозамин. Используемый в настоящем документе термин «производное галактозы» включает как галактозу, так и производные галактозы, обладающие сродством к асиалогликопротеиновому рецептору, равным или превышающим сродство галактозы. Терминальное производное галактозы присоединяется к молекуле через ее углерод C-I. Рецептор асиалогликопротеина (ASGPr) в основном экспрессируется на гепатоцитах и связывает разветвленные галактозо-концевые гликопротеины. Кластер галактозы имеет три терминальных галактозамина или производных галактозамина, каждое из которых имеет сродство к асиалогликопротеиновому рецептору. Другой кластер галактозы имеет три концевых N-ацетилгалактозамина. Другие термины, распространенные в данной области техники, включают трехантенную галактозу, трехвалентную галактозу и тример галактозы. Известно, что кластеры производных галактозы с тремя антеннами связаны с ASGPr с большей аффинностью, чем структуры производных галактозы с биантеннами или моноантеннами. Поливалентность необходима для достижения сродства к нМ.

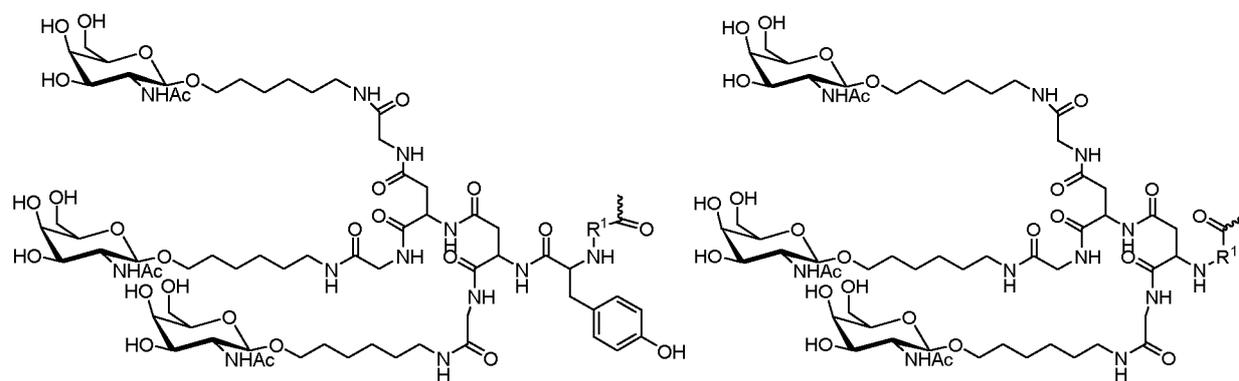
**[355]** Кластер галактозы может включать два или предпочтительно три производных галактозы, каждое из которых связано с центральной точкой ветвления. Производные галактозы присоединены к центральной точке ветвления через атомы углерода C-I сахаридов. Производное галактозы предпочтительно связано с точкой ветвления через линкеры или спейсеры. В некоторых аспектах, спейсер представляет собой гибкий гидрофильный спейсер, например, спейсер из ПЭГ, такой как спейсер из ПЭГЗ. Точка ветвления может быть любой небольшой молекулой, которая позволяет присоединить три производных галактозы и, кроме того, позволяет присоединить точку ветвления к олигомеру. Типовой группой точек ветвления является дилизин. Молекула дилизина

содержит три аминогруппы, через которые могут быть присоединены три производных галактозы, и карбоксильную реакционноспособную группу, через которую дилизин может быть присоединен к олигомеру. Присоединение точки ветвления к олигомеру может происходить через линкер или спейсер. В некоторых аспектах, спейсер представляет собой гибкий гидрофильный спейсер, например, спейсер из ПЭГ, такой как спейсер из ПЭГ3 (три этиленовых звена). Кластер галактозы может быть присоединен к 3'- или 5'-концу олигомера с использованием методов, известных в данной области.

**[356]** В некоторых аспектах настоящего изобретения фрагмент конъюгата конъюгата антисмыслового олигонуклеотида содержит или состоит из Conj 1, 2, 3, 4 и Conj 1a, 2a, 3a и 4a. В некоторых аспектах, фрагмент конъюгата содержит Conj 2a или состоит из него. В некоторых аспектах, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 и 19.

**[357]** Таким образом, каждый углеводный фрагмент кластера GalNAc (например, GalNAc) может быть присоединен к олигомеру через спейсер, такой как (поли)этиленгликолевый линкер (ПЭГ), такой как ди-, три-, тетра-, пента-, гекса-этиленгликолевый линкер. Как показано выше, фрагмент ПЭГ образует спейсер между фрагментом сахара галактозы и пептидным (показан трилизин) линкером.

**[358]** В некоторых аспектах, кластер GalNAc содержит пептидный линкер, например, трипептид Tyr-Asp(Asp) или дипептид Asp(Asp), который присоединен к олигомеру (или к области Y или области B) через бирадикальный линкер, например, кластер GalNAc может содержать следующие бирадикальные линкеры:



**[359]** R1 представляет собой бирадикал, предпочтительно выбранный из -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-, -C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>-, -C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>-, -C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>-, 1,4-циклогексил(-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-), 1,4-фенил(-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-), -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>(OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>2</sub>- или -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>(OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>3</sub>-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -C(O)C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-, -C(O)C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-, -C(O)C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>-,

$C(O)C_5H_{10}$ -,  $-C(O)C_6H_{12}$ -, 1,4-циклогексил( $-C(O)C_6H_{10}$ -), 1,4-фенил( $-C(O)C_6H_4$ -),  $-C(O)C_2H_4OC_2H_4$ -,  $-C(O)C_2H_4(OC_2H_4)_2$ - или  $-C(O)C_2H_4(OC_2H_4)_3$ -.

**[360]** В некоторых аспектах, R1 представляет собой бирадикал, предпочтительно выбранный из  $-C_2H_4$ -,  $-C_3H_6$ -,  $-C_4H_8$ -,  $-C_5H_{10}$ -,  $-C_6H_{12}$ -, 1,4-циклогексил( $-C_6H_{10}$ -), 1,4-фенил( $-C_6H_4$ -),  $-C_2H_4OC_2H_4$ -,  $-C_2H_4(OC_2H_4)_2$ - или  $-C_2H_4(OC_2H_4)_3$ -.

**[361]** Углеводный конъюгат (например, GalNAc) или углеводный фрагмент -линкер (например, углеводный фрагмент -ПЭГ) может быть ковалентно присоединен (связан) к олигомеру через группу точки разветвления, такую как аминокислота или пептид, который подходящим образом содержит две или более аминогрупп (такие как 3, 4 или 5), такие как лизин, дилизин, трилизин или тетрализин. Молекула трилизина содержит четыре аминогруппы, через которые могут быть присоединены три углеводные конъюгированные группы, такие как галактоза и производные (например, GalNAc), и дополнительный конъюгат, такой как гидрофобный или липофильный фрагмент/группа, и карбоксильная реакционноспособная группа, через которую к олигомеру может быть присоединен трилизин. Дополнительный конъюгат, такой как липофильный/гидрофобный фрагмент, может быть присоединен к остатку лизина, который присоединен к олигомеру.

**[362]** Конъюгаты GalNAc для применения с олигомерами LNA по настоящему изобретению не требуют фармакокинетического модулятора (например, липофильного фрагмента, раскрытого ниже). Таким образом, в некоторых аспектах, конъюгат GalNAc не связан ковалентно с липофильным или гидрофобным фрагментом, таким как описанные в настоящем документе, например, не содержит C8-C36 жирную кислоту или стерол. Соответственно, настоящее изобретение предлагает конъюгаты олигомера LNA GalNAc, которые не содержат конъюгированного липофильного или гидрофобного фармакокинетического модулятора.

### **III.b Липофильные фрагменты**

**[363]** Олигонуклеотид по настоящему изобретению может дополнительно содержать один или несколько дополнительных фрагментов конъюгата (например, вместо или в дополнение к фрагменту GalNAc), из которых особенно интересны липофильные или гидрофобные фрагменты, например, когда группа конъюгата представляет собой углеводный фрагмент. Такие липофильные или гидрофобные фрагменты могут действовать как фармакокинетические модуляторы и могут быть ковалентно связаны либо с углеводным конъюгатом, либо с линкером, связывающим углеводный конъюгат с олигомером, либо с линкером, связывающим несколько углеводных конъюгатов

(поливалентных) конъюгатов, либо с олигомером, необязательно через линкер, такой как биорасщепляемый линкер.

**[364]** Таким образом, олигомер или конъюгат может содержать фармакокинетический модулятор, такой как липофильный или гидрофобный фрагменты. Такие фрагменты раскрыты в контексте конъюгатов мРНК в WO 2012/082046, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Гидрофобный фрагмент может содержать C8-C36 жирную кислоту, которая может быть насыщенной или ненасыщенной. В некоторых аспектах, можно использовать C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22, C24, C26, C28, C30, C32 и C34 жирные кислоты. Гидрофобная группа может иметь 16 или более атомов углерода.

**[365]** Типичные подходящие гидрофобные группы могут быть выбраны из группы, включающей: стерол, холестерин, пальмитоил, гексадец-8-еноил, олеил, (9E, 12E)-октадека-9,12-диеноил, диоктаноил и C16-C20 ацил. Гидрофобные группы, содержащие менее 16 атомов углерода, менее эффективны в усилении нацеливания на полинуклеотиды, но их можно использовать в нескольких копиях (например, 2х, таких как 2х C8 или C10, C12 или C14) для повышения эффективности. Фармакокинетические модуляторы, применимые в качестве молекул, нацеленных на полинуклеотиды, могут быть выбраны из группы, состоящей из холестерина, алкильной группы, алкенильной группы, алкинильной группы, арильной группы, аралкильной группы, аралкенильной группы и аралкинильной группы, каждая из которых может быть линейной, разветвленной или циклической. Фармакокинетические модуляторы предпочтительно представляют собой углеводороды, содержащие только атомы углерода и водорода. Однако могут быть разрешены замещения или гетероатомы, сохраняющие гидрофобность, например, фтор.

### **III.c Липофильные конъюгаты**

**[366]** В некоторых аспектах, фрагмент конъюгата представляет собой или может содержать липофильный фрагмент, такой как стерол (например, холестерин, холестерил, холестанол, стигмастерол, холановая кислота и эргостерол). В некоторых аспектах, фрагмент конъюгата представляет собой или содержит токоферол (показанный как Conj 6 и Conj 6a на **ФИГ. 2**). В некоторых аспектах, фрагмент конъюгата представляет собой или может содержать холестерин (показанный как Conj 5 и Conj 5a на **ФИГ. 2**).

**[367]** В некоторых аспектах, фрагмент конъюгата представляет собой или может содержать липид, фосфолипид или липофильный спирт, такой как катионный липид,

нейтральный липид, сфинголипид и жирную кислоту, такую как стеариновая, олеиновая, элаидиновая, линолевая, линоленовая и миристиновая кислоты. В некоторых аспектах, жирная кислота содержит насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь C4-C30. Алкильная цепь может быть линейной или разветвленной.

**[368]** Липофильные фрагменты конъюгата можно использовать, например, для противодействия гидрофильной природе олигомерного соединения и улучшения проникновения в клетки.

**[369]** Липофильные фрагменты включают, например, стеролы, станолы и стероиды и родственные соединения, такие как холестерин, тиохолестерол, ланостерол, копростанол, стигмастерол, эргостерол, кальциферол, холевая кислота, дезоксихолевая кислота, эстрон, эстрадиол, эстратриол, прогестерон, стильбестрол, тестостерон, андростерон, дезоксикортикостерон, кортизон, 17-гидроксикортикостерон, их производные и т.п. В некоторых аспектах, конъюгат может быть выбран из группы, состоящей из холестерина, тиохолестерола, ланостерола, копростанола, стигмастерола, эргостерола, кальциферола, холевой кислоты, дезоксихолевой кислоты, эстрона, эстрадиола, эстратриола, прогестерона, стильбестрола, тестостерона, андростерона, дезоксикортикостерона, кортизона и 17-гидроксикортикостерона. Другие фрагменты липофильного конъюгата включают алифатические группы, такие как, например, неразветвленные, разветвленные и циклические алкилы, алкенилы и алкинилы. Алифатические группы могут иметь, например, от 5 до около 50, от 6 до около 50, от 8 до около 50 или от 10 до около 50 атомов углерода. Примеры алифатических групп включают ундецил, додецил, гексадецил, гептадецил, октадецил, нонадецил, терпены, борнил, адамантил, их производные и т.п. В некоторых аспектах, один или несколько атомов углерода в алифатической группе могут быть заменены гетероатомом, таким как O, S или N (например, геранилосигексил). Другие подходящие фрагменты липофильного конъюгата включают алифатические производные глицеринов, такие как алкилглицерины, бис(алкил)глицерины, трис(алкил)глицерины, моноглицериды, диглицериды и триглицериды. В некоторых аспектах, липофильный конъюгат представляет собой ди-гексилдецил-рац-глицерин или 1,2-ди-О-гексилдецил-рац-глицерин или их фосфонаты. Насыщенные и ненасыщенные жирные функциональные группы, такие как, например, жирные кислоты, жирные спирты, жирные эфиры и жирные амины, также могут служить в качестве липофильных конъюгированных фрагментов. В некоторых аспектах, жирные функциональные группы могут содержать от около 6 до около 30 или от около 8 до около 22 атомов углерода. Примеры жирных кислот включают каприновую, каприловую, лауриновую,

пальмитиновую, миристиновую, стеариновую, олеиновую, линолевую, линоленовую, арахидоновую, эйкозеновую кислоты и т.п.

**[370]** В дополнительных аспектах липофильные конъюгированные группы могут представлять собой полициклические ароматические группы, содержащие от 6 до около 50, от 10 до около 50 или от 14 до около 40 атомов углерода. Примеры полициклических ароматических групп включают пирены, пурины, акридины, ксантены, флуорены, фенантрены, антрацены, хинолины, изохинолины, нафталины, их производные и т.п. Другие подходящие фрагменты липофильного конъюгата включают ментолы, тритилы (например, диметокситритил (DMT)), феноксазины, липоевую кислоту, фосфолипиды, простые эфиры, тиоэфиры (например, гексил-S-тримитилтиол), их производные и тому подобное.

**[371]** Олигомерные соединения, содержащие фрагменты конъюгата, обладающие сродством к липопротеинам низкой плотности (ЛПНП), могут помочь обеспечить эффективную систему адресной доставки. Высокий уровень экспрессии рецепторов ЛПНП на опухолевых клетках делает ЛПНП привлекательным носителем для селективной доставки лекарств к этим клеткам. Фрагменты, обладающие сродством к ЛПНП, включают множество липофильных групп, таких как стероиды (например, холестерин), жирные кислоты, их производные и их комбинации. В некоторых аспектах, фрагменты конъюгата, обладающие сродством к ЛПНП, могут представлять собой диолеиловые эфиры холевых кислот, такие как хенодезоксихолева кислота и литохолева кислота. В некоторых аспектах, липофильные конъюгаты могут представлять собой или могут содержать биотин. В некоторых аспектах, фрагмент липофильного конъюгата может представлять собой или может содержать глицерид или сложный эфир глицерида.

**[372]** Липофильные конъюгированные фрагменты, такие как стеролы, станолы и красители, такие как холестерин или описанные в настоящем документе, могут быть использованы для усиления доставки олигонуклеотида, например, в печень (как правило, в гепатоциты). В некоторых аспектах, настоящего изобретения фрагмент конъюгата антисмыслового олигонуклеотида содержит или состоит из Conj 5, 5a, 6 или 6a. В некоторых аспектах, фрагмент конъюгата содержит Conj 5a или состоит из него. В некоторых аспектах, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 11.

### III.d Линкеры

[373] Связь или линкер представляет собой соединение между двумя атомами, которое связывает одну интересующую химическую группу или сегмент с другой интересующей химической группой или сегментом посредством одной или нескольких ковалентных связей. Фрагменты конъюгата (или нацеливающие или блокирующие фрагменты) могут быть присоединены к олигомерному соединению непосредственно или через связывающий фрагмент (линкер или связка) - линкер. Линкеры представляют собой бифункциональные фрагменты, которые служат для ковалентного соединения третьей области, например, части конъюгата с олигомерным соединением (например, с областью А). В некоторых аспектах, линкер содержит цепную структуру или олигомер из повторяющихся звеньев, таких как этиленгликоль или аминокислотные звенья. Линкер может иметь по меньшей мере две функции: одну для присоединения к олигомерному соединению, а другую для присоединения к фрагменту конъюгата. Примеры функциональных групп линкера могут быть электрофильными для взаимодействия с нуклеофильными группами на олигомерной или конъюгатной части или нуклеофильными для взаимодействия с электрофильными группами. В некоторых аспектах, функции линкера включают амина, гидроксил, карбоновую кислоту, тиол, фосфорамидат, фосфоротиоат, фосфат, фосфит, ненасыщенность (например, двойные или тройные связи) и т.п. Некоторые примеры линкеров включают 8-амино-3,6-диоксаоктановую кислоту (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), 6-аминогексановую кислоту (АНЕХ или АНА), 6-аминогексилокси, 4-аминомасляная кислота, 4-аминоциклогексилкарбоновая кислота, сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксо-(6-амидокапроат) (LCSMCC), сукцинимидил-малеимино-бензоилат (MBS), сукцинимидил-N-ε-малеимино-капроилат (EMCS), сукцинимидил-6-(β-малеимино-пропионамидо)гексаноат (SMPH), сукцинимидил-N-(α-малеиминоацетат) (AMAS), сукцинимидил-4-(п-малеиминофенил)бутират (SMPB), β-аланин (β-ALA), фенилглицин (PHG), 4-аминоциклогексановая кислота (ACHC), β-(циклопропил)аланин (β-CYPR), аминокислоты и т.п.

[374] В данной области техники известно большое разнообразие дополнительных линкерных групп, которые можно использовать для присоединения фрагментов конъюгата к олигомерным соединениям. Обзор многих полезных линкерных групп можно найти, например, в *Antisense Research and Applications*, S.T. Crooke and B. Lebleu, Eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993, p. 303-350.

[375] Линкеры и их применение для получения конъюгатов олигомерных соединений представлены в данной области техники, например, в WO 96/11205 и WO 98/52614 и в патентах США №№ 4948882; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5580731; 5486603; 5608046; 4587044; 4667025; 5254469; 5245022; 5112963; 5391723; 5510475; 5512667; 5574142; 5684142; 5770716; 6096875; 6335432; и 6335437; и WO 2012/083046, все из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

[376] Используемый в настоящем документе термин «физиологически лабильная связь» представляет собой лабильную связь, которая расщепляется в условиях, обычно встречающихся в организме млекопитающего, или аналогичных тем, которые встречаются в организме млекопитающего (также называемая расщепляемым линкером, проиллюстрирована как область В на ФИГ. 12 и ФИГ. 13). Физиологически лабильные связывающие группы выбирают таким образом, чтобы они подвергались химическому превращению (например, расщеплению) при нахождении в определенных физиологических условиях. Внутриклеточные условия млекопитающих включают химические условия, такие как уровень pH, температура, окислительные или восстанавливающие условия или агенты, а также концентрация солей, обнаруженные в клетках млекопитающих или аналогичные тем, которые встречаются в клетках млекопитающих. Внутриклеточные состояния млекопитающих также включают наличие ферментативной активности, обычно присутствующей в клетке млекопитающего, такой как протеолитические или гидролитические ферменты. В некоторых аспектах, расщепляемый линкер восприимчив к нуклеазе(ам), которая может, например, экспрессироваться в целевой клетке, и как таковая, как подробно описано в настоящем документе, линкер может представлять собой короткую область (например, 1-10) нуклеозидов, связанных фосфодиэфирными связями, такие как нуклеозиды ДНК.

[377] Химическая трансформация (расщепление лабильной связи) может быть инициирована добавлением фармацевтически приемлемого агента к клетке или может происходить спонтанно, когда молекула, содержащая лабильную связь, достигает соответствующей внутри- и/или внеклеточной среды. Например, pH-лабильная связь может быть расщеплена, когда молекула входит в подкисленную эндосому. Таким образом, pH-лабильная связь может рассматриваться как эндосомально расщепляемая связь. Расщепляемые ферментами связи могут быть расщеплены при воздействии ферментов, таких как те, которые присутствуют в эндосомах, лизосомах или в цитоплазме. Дисульфидная связь может быть расщеплена при попадании молекулы в восстанавливающую среду цитоплазмы клетки. Таким образом, дисульфид можно

рассматривать как цитоплазматическо-расщепляемую связь. Используемый в настоящем документе рН-лабильная связь представляет собой лабильную связь, которая селективно разрушается в кислых условиях ( $\text{pH} < 7$ ). Такие связи также можно назвать эндосомально-лабильными связями, поскольку клеточные эндосомы и лизосомы имеют уровень рН менее 7.

### **Ш.е Олигомерсвязанные биорасщепляемые конъюгаты**

**[378]** Олигомерное соединение может необязательно содержать вторую область (область В), которая расположена между олигомером (обозначаемым как область А) и конъюгатом (обозначаемым как область С). См. **ФИГ. 12** и **ФИГ. 13** для иллюстрации). Область В может представлять собой линкер, такой как расщепляемый линкер (также называемый физиологически лабильной связью). Чувствительные к нуклеазе физиологически лабильные связи: в некоторых аспектах, олигомер (также называемый олигомерным соединением) по настоящему изобретению (или конъюгат) содержит три области:

- i) первую область (область А), которая включает, например, 16-18 последовательных нуклеотидов;
- ii) вторую область (область В), которая содержит биорасщепляемый линкер; и,
- iii) третья область (С), которая включает конъюгированный фрагмент, нацеливающий фрагмент, активирующий фрагмент, при этом третья область ковалентно связана со второй областью.

**[379]** В некоторых аспектах, область В может представлять собой фосфатный нуклеотидный линкер. Например, такие линкеры можно использовать, когда конъюгат представляет собой липофильный конъюгат, такой как липид, жирная кислота, стерол, такой как холестерин или токоферол. Линкеры из фосфатных нуклеотидов можно также использовать для других конъюгатов, например, углеводных конъюгатов, таких как GalNAc.

#### ***Ш.е.1 Пептидные линкеры***

**[380]** В некоторых аспектах, биорасщепляемый линкер (область В) представляет собой пептид, такой как трилизиновый пептидный линкер, который можно использовать в конъюгате полиGalNAc, таком как конъюгат triGalNAc. См. также упомянутые в настоящем документе пептидные бирадикалы.

**[381]** Другие линкеры, известные в данной области, которые можно использовать, включают дисульфидные линкеры.

### *III.e.2 Фосфатные нуклеотидные линкеры*

**[382]** В некоторых аспектах, область В содержит от 1 до 6 нуклеотидов, которые ковалентно связаны с 5'- или 3'-нуклеотидом первой области (области А), например, через группу межнуклеозидной связи, такую как фосфодиэфирная связь, при этом или

а. межнуклеозидная связь между первой и второй областью представляет собой фосфодиэфирную связь, а нуклеозид второй области [например, непосредственно] примыкающей к первой области, представляет собой либо ДНК, либо РНК; и/или

б. по меньшей мере 1 нуклеозид второй области представляет собой ДНК- или РНК-нуклеозид, связанный фосфодиэфирной связью.

**[383]** В некоторых аспектах, область А и область В образуют единую непрерывную нуклеотидную последовательность длиной 16-22 нуклеотида.

**[384]** В некоторых аспектах, межнуклеозидная связь между первой и второй областями может рассматриваться как часть второй области.

**[385]** В некоторых аспектах, имеется фосфорсодержащая связующая группа между второй и третьей областью. Фосфорсодержащая связующая группа может, например, представлять собой фосфатную (фосфодиэфирную), фосфоротиоатную, фосфородитиоатную или боранофосфатную группу. В некоторых аспектах, эта фосфорсодержащая связывающая группа расположена между второй областью и линкерной областью, которая присоединена к третьей области. В некоторых аспектах, фосфатная группа представляет собой фосфодиэфир.

**[386]** Таким образом, в некоторых аспектах, олигомерное соединение содержит по меньшей мере две фосфодиэфирные группы, при этом по меньшей мере одна соответствует указанному выше утверждению, а другая расположена между второй и третьей областями, необязательно между линкерной областью и второй областью.

**[387]** В некоторых аспектах, третья область представляет собой активированную группу, такую как активированную группу для использования в конъюгации. В этом отношении настоящее раскрытие также обеспечивает активированные олигомеры, включающие области А и В и активированную группу, например, промежуточное соединение, которое является пригодным для последующего связывания с третьей областью, таким как подходящее для конъюгации.

**[388]** В некоторых аспектах, третья область представляет собой реакционноспособную группу, такую как реакционноспособная группа для использования в конъюгации. В этом отношении настоящее раскрытие также обеспечивает олигомеры, включающие области А

и В и реакционноспособную группу, например, промежуточное соединение, которое представляет собой соединение пригодное для последующего связывания с третьей областью, такое как соединение пригодное для конъюгации. Реакционноспособная группа может, в некоторых аспектах, содержать аминогруппу или спиртовую группу, такую как аминогруппа.

**[389]** В некоторых аспектах, область А содержит по меньшей мере одну, такую как 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 межнуклеозидные связи, отличные от фосфодиэфирных, такие как межнуклеозидные связи, которые (необязательно независимо) выбирают из группы, состоящей из фосфоротиоата, фосфородитиоата и боранофосфата, и метилфосфоната, такого как фосфоротиоат. В некоторых аспектах, область А содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь. В некоторых аспектах, по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 75%, например, по меньшей мере 90% межнуклеозидных связей, например, все межнуклеозидные связи в области А являются отличными от фосфодиэфирных связей, например, являются фосфоротиоатными связями. В некоторых аспектах, все межнуклеозидные связи в области А отличны от фосфодиэфирных.

**[390]** В некоторых аспектах, олигомерное соединение содержит антисмысловый олигонуклеотид, такой как конъюгат антисмыслового олигонуклеотида. Антисмысловый олигонуклеотид может представлять собой или может содержать первую область и необязательно вторую область. В этом отношении в некоторых аспектах, область В может образовывать часть непрерывной последовательности азотистых оснований, которая комплементарна мишени (нуклеиновой кислоте). В других аспектах область В может не иметь комплементарности с мишенью.

**[391]** В качестве альтернативы, в некоторых аспектах, настоящее изобретение предлагает не фосфодиэфирное связывание, такое как связанный тиофосфатом олигонуклеотид (например, антисмысловый олигонуклеотид), который имеет по меньшей мере один терминальный (5' и/или 3') ДНК или РНК нуклеозид, связанный с соседним нуклеозидом олигонуклеотида посредством фосфодиэфирной связи, при этом терминальный ДНК или РНК нуклеозид дополнительно ковалентно связан с фрагментом конъюгата, нацеливающим фрагментом или блокирующим фрагментом, необязательно через линкерный фрагмент.

**[392]** В некоторых аспектах, олигомерное соединение содержит антисмысловый олигонуклеотид, такой как конъюгат антисмыслового олигонуклеотида. Антисмысловый олигонуклеотид может представлять собой или может содержать первую область и

необязательно вторую область. В этом отношении в некоторых аспектах, область В может образовывать часть непрерывной последовательности азотистых оснований, которая комплементарна мишени (нуклеиновой кислоте). В других аспектах область В может не иметь комплементарности с мишенью.

**[393]** В некоторых аспектах, по меньшей мере два последовательных нуклеозида второй области представляют собой ДНК нуклеозиды (например, по меньшей мере 3, или 4, или 5 последовательных нуклеотидов ДНК).

**[394]** В таком аспекте олигонуклеотид по настоящему изобретению может быть описан в соответствии со следующей формулой: 5'-А-РО-В[У]Х-3' или 3'-А-РО-В[У] Х-5', где А представляет собой область А, РО представляет собой фосфодиэфирную связь, В представляет собой область В, У представляет собой необязательную связывающую группу, а Х представляет собой конъюгат, нацеливающую, блокирующую группу или реакционноспособную или активированную группу.

**[395]** В некоторых аспектах, область В содержит 3'-5' или 5'-3': (i) присоединенную через фосфодиэфирную связь к 5'- или 3'- нуклеозид области А, (ii) ДНК или РНК нуклеозид, такой как ДНК нуклеозид и (iii) дополнительно присоединенный через фосфодиэфирную связь 5'-А-РО-В-РО-3' или 3'-А-РО-В-РО-5'.

**[396]** Дополнительная фосфодиэфирная связь связывает нуклеозид области В с одним или несколькими дополнительными нуклеозидами, такими как один или несколько ДНК или РНК нуклеозидов, или может связываться с Х (представляет собой конъюгат, нацеливающую, или блокирующую группу, или реакционноспособную, или активированную группу) необязательно через связывающую группу (У).

**[397]** В некоторых аспектах, область В содержит 3'-5' или 5'-3': i) присоединенную через фосфодиэфирную связь к 5'- или 3'- нуклеозид области А, ii) от 2 до 10 соединенных через фосфодиэфирную связь ДНК или РНК нуклеозидов, таких как ДНК нуклеозид, и необязательно iii) дополнительно присоединенный через фосфодиэфирную связь:



где А представляет собой область А, [РО-В]n представляет собой область В, где n равен 1-10, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, РО представляет собой необязательно фосфодиэфирную связывающую группу между областью В и Х (или У, если она присутствует).

**[398]** В некоторых аспектах, настоящее описание предлагает соединения согласно (или включающие) одной из следующих формул:

5' [Область А] - РО - [область В] 3' -Y - X

5' [Область А] - РО - [область В] -РО 3' -Y - X

5' [Область А] - РО - [область В] 3' - X

5' [Область А] - РО - [область В] -РО 3' - X

3' [Область А] - РО - [область В] 5' -Y - X

3' [Область А] - РО - [область В] -РО 5' -Y - X

3' [Область А] - РО - [область В] 5' - X

3' [Область А] - РО - [область В] -РО 5' - X

**[399]** Область В, может, например, включать или состоять из:

5' ДНК3'

3' ДНК 5'

5' ДНК-РО-ДНК-3'

3' ДНК-РО-ДНК-5'

5' ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК 3'

3' ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК 5'

5' ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК 3'

3' ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК 5'

5' ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК 3'

3' ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК 5'

**[400]** Следует признать, что биорасщепляемые линкеры, связанные с фосфатом, могут использовать нуклеозиды, отличные от ДНК и РНК. Биологически расщепляемые нуклеотидные линкеры можно идентифицировать с помощью анализов в Примере 6.

**[401]** В некоторых аспектах, соединение по настоящему изобретению содержит биорасщепляемый линкер (также называемый физиологически лабильным линкером, чувствительными к нуклеазам физиологически лабильными связями или чувствительным к нуклеазе линкером), например, фосфатно-нуклеотидный линкер (такой как область В) или пептидный линкер, который соединяет олигомер (или непрерывную нуклеотидную последовательность или область А) с фрагментом конъюгата (или областью С).

**[402]** Восприимчивость к расщеплению в анализах, показанных в примере 6, можно использовать для определения того, является ли линкер биорасщепляемым или физиологически лабильным.

**[403]** Биологически расщепляемые линкеры в соответствии с настоящим изобретением включают линкеры, которые подвержены расщеплению в целевой ткани (т.е. физиологически лабильной), например, в печени и/или почке. Предпочтительно, чтобы скорость расщепления, наблюдаемая в целевой ткани, была выше, чем в сыворотке крови. Подходящие способы определения уровня (%) расщепления в ткани (например, в печени или почке) и в сыворотке приведены в Примере 6. В некоторых аспектах, биорасщепляемый линкер (также называемый физиологически лабильным линкером или чувствительным к нуклеазе линкером), такой как область В, в соединении по настоящему изобретению расщепляются по меньшей мере на около 20%, например, расщепляются по меньшей мере на около 30%, например, расщепляются по меньшей мере на около 40%, например, расщепляются по меньшей мере на около 50%, например, расщепляется по меньшей мере на около 60%, например, расщепляются по меньшей мере на около 70%, например, расщепляются по меньшей мере на около 75% в анализе гомогената печени или почки по Примеру 6. В некоторых аспектах, расщепление (%) в сыворотке, как используется в анализе в Примере 6, составляет менее около 30%, менее около 20%, например, менее около 10%, например, менее 5%, например, менее около 1%.

**[404]** В некоторых аспектах, которые могут быть одинаковыми или разными, биорасщепляемый линкер (также называемый физиологически лабильным линкером или чувствительным к нуклеазе линкером), такой как область В, в соединении по настоящему изобретению чувствителен к Расщепление нуклеазой S1. Восприимчивость к расщеплению S1 можно оценить с помощью нуклеазного анализа S1, показанного в Примере 6. В некоторых аспектах, биорасщепляемый линкер (также называемый физиологически лабильным линкером или чувствительным к нуклеазе линкером), такой как область В, в соединении по настоящему изобретению, расщепляется по меньшей мере на около 30%, например, расщепляется по меньшей мере на около 40%, например, расщепляется по меньшей мере на около 50%, например, расщепляется по меньшей мере на около 60%, например, расщепляется по меньшей мере на около 70%, например, расщепляется по меньшей мере на около 80%, например, расщепляется по меньшей мере на около 90%, например, расщепляется по меньшей мере на около 95% после 120-минутной инкубации с нуклеазой S1 в соответствии с анализом, использованным в Примере 6.

**[405] Выбор последовательности в области В:** В некоторых аспектах, олигомер по настоящему изобретению содержит область (область В), которая не комплементарна целевой последовательности. В других аспектах область В действительно образует

последовательность, комплементарную целевой последовательности. В некоторых аспектах, области А и В вместе могут образовывать единую непрерывную последовательность, комплементарную целевой последовательности.

**[406]** Некоторые аспекты относятся к последовательности оснований в области В, выбранной для обеспечения оптимального сайта расщепления эндонуклеазой, на основе преобладающих ферментов расщепления эндонуклеазой, присутствующих в целевой ткани, клетке или субклеточном компартменте. В этом отношении путем выделения клеточных экстрактов из целевых тканей и тканей, не являющихся мишенями, последовательности расщепления эндонуклеазой для использования в области В могут быть выбраны на основе предпочтительной активности расщепления в желаемой целевой клетке (например, печени/гепатоцитах) по сравнению с нецелевыми клетками (например, почка). В этом отношении эффективность соединения для подавления мишени может быть оптимизирована для желаемой ткани/клетки.

**[407]** В некоторых аспектах, область В содержит динуклеотид с последовательностью АА, АТ, АС, АГ, ТА, ТТ, ТС, ТГ, СА, СТ, СС, СГ, ГА, ГТ, ГС или GG, где С может быть 5-метилцитозином и/или Т могут быть заменены на U. В некоторых аспектах, область В содержит тринуклеотидную последовательность ААА, ААТ, ААС, ААГ, АТА, АТТ, АТС, АТГ, АСА, АСТ, АСС, АСГ, АГА, АГТ, АГС, АГГ, ТАА, ТАТ, ТАС, ТАГ, ТТА, ТТТ, ТТС, ТАГ, ТСА, ТСТ, ТСС, ТСГ, ТГА, ТГТ, ТГС, ТГГ, САА, САТ, САС, САГ, СТА, СТГ, СТС, СТТ, ССА, ССТ, ССС, ССГ, СГА, СГТ, СГС, СГГ, ГАА, ГАТ, ГАС, САГ, ГТА, ГТТ, ГТС, ГТГ, ГСА, ГСТ, ГСС, ГСГ, ГГА, ГГТ, ГГС и GGG, где С может представлять собой 5-метилцитозин и/или Т может быть заменен на U.

**[408]** В некоторых аспектах, область В содержит тетрануклеотид с последовательностью АААХ, ААТХ, ААСХ, ААГХ, АТАХ, АТТХ, АТСХ, АТГХ, АСАХ, АСТХ, АССХ, АСГХ, АГАХ, АГТХ, АГСХ, АГГХ, ТААХ, ТАТХ, ТАСХ, , ТАГХ, ТТАХ, ТТТХ, ТТСХ, ТАГХ, ТСАХ, ТСТХ, ТССХ, ТСГХ, ТГАХ, ТГТХ, ТГСХ, ТГГХ, СААХ, САТХ, САСХ, САГХ, СТАХ, СТГХ, СТСХ, СТТХ, ССАХ, ССТХ, СССХ, ССГХ, СГАХ, СГТХ, СГСХ, СГГХ, ГААХ, ГАТХ, ГАСХ, САГХ, ГТАХ, ГТТХ, ГТСХ, ГТГХ, ГСАХ, ГСТХ, ГССХ, ГСГХ, ГГАХ, ГГТХ, ГГСХ и GGGХ, где Х может быть выбран из группы, состоящей из А, Т, U, G, С и их аналогов, где С может представлять собой 5-метилцитозин и/или Т может быть заменен на U. Следует понимать, что когда речь идет о (природных) азотистых основаниях А, Т, U, G, С, они могут быть заменены аналогами азотистых оснований, которые функционируют как эквивалентное природное азотистое

основание (например, пара оснований с комплементарным нуклеозидом). В некоторых аспектах, область В не содержит Т или U.

#### **IV. Медицинские показания**

**[409]** В некоторых аспектах, фармацевтические композиции по настоящему изобретению (например, пероральный состав, содержащий, например, CIVI 008 и средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC, его производное, фармацевтически приемлемый гидрат, сольват или его соль, или любую их комбинацию) можно использовать для лечения состояний, связанных с повышенной экспрессией или экспрессией нормального, мутантного, аллельного варианта или сплайс-варианта формы гена PCSK9. Настоящее описание дополнительно обеспечивает фармацевтическую композицию согласно настоящему описанию (например, пероральный состав, содержащий, например, CIVI 008 и средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC, его производное, фармацевтически приемлемый гидрат, сольват, или его соли, или любую их комбинацию) для применения в производстве лекарственного средства для лечения заболевания, расстройства или состояния, как указано в настоящем документе.

**[410]** В настоящем изобретении предложены способы лечения млекопитающего, например человека, страдающего или подверженного состояниям, связанным с аномальными уровнями и/или активностью PCSK9, включающие введение млекопитающему терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции из настоящего описания (например, пероральный состав, содержащий, например, CIVI 008 и средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC, его производное, фармацевтически приемлемый гидрат, сольват или соль, или любую их комбинацию).

**[411]** Заболевание или нарушение, как упоминается в настоящем документе, может, в некоторых аспектах, быть связано с мутацией в гене PCSK9 или гене, белковый продукт которого связан с PCSK9 или взаимодействует с ним. Следовательно, в некоторых аспектах, мишенью является РНК. В некоторых аспектах, мРНК представляет собой пре-мРНК. В некоторых аспектах, РНК представляет собой интрон в мРНК. В некоторых аспектах, РНК представляет собой экзон в РНК. В некоторых аспектах, РНК представляет собой соединение между интроном и экзоном. В некоторых аспектах, РНК представляет собой мРНК нормального PCSK9, который активируется, например, дефектным промотором или другими компонентами метаболического или сигнального пути,

охватывающего PCSK9. В некоторых аспектах, мРНК происходит из аллельного варианта гена PCSK9. В некоторых аспектах, мРНК происходит из сплайс-варианта нормального или мутантного гена PCSK9. В некоторых аспектах, мРНК происходит из мутантной формы гена PCSK9 (например, мутанта с приобретением функции).

**[412]** PCSK9 играет главную регулирующую роль в гомеостазе холестерина, главным образом, за счет снижения уровней РЛПНП на плазматической мембране. Снижение уровней РЛПНП приводит к снижению метаболизма частиц ЛПНП, что может привести к гиперхолестеринемии. Когда ЛПНП связывается с РЛПНП, это индуцирует интернализацию комплекса РЛПНП-ЛПНП внутри эндосомы. Когда PCSK9 связывается с РЛПНП (через домен EGF-A), PCSK9 предотвращает конформационные изменения комплекса рецептор-лиганд. Это ингибирование вместо этого перенаправляет РЛПНП на лизосому.

**[413]** PCSK9 также играет важную роль в продукции кишечного липопротеина апоВ, богатого триглицеридами, в тонком кишечнике и постпрандиальной липемии. Варианты PCSK9 могут снижать или повышать уровень циркулирующего холестерина. Другие варианты связаны с редкой аутомно-доминантной наследственной гиперхолестеринемией (HCHOLA3). Мутации повышают его протеазную активность, снижая уровень ЛПНП и предотвращают поглощение холестерина клетками. PCSK9 в высокой степени экспрессируется в стенках артерий, таких как эндотелий, гладкомышечные клетки и макрофаги, с местным эффектом, который может регулировать сосудистый гомеостаз и атеросклероз. Соответственно, PCSK9 оказывает проатеросклеротическое действие и регулирует синтез липопротеинов.

**[414]** PCSK9 участвует в метаболизме глюкозы и ожирении, регуляции реабсорбции натрия в почках, что имеет значение при гипертензии. Кроме того, PCSK9 может быть вовлечен в бактериальные или вирусные инфекции и сепсис.

**[415]** В некоторых аспектах, ген PCSK9 представляет собой аллельный вариант, выбранный из Pro174Ser PCSK0, Ser127Arg PCSK9, Phe216Leu PCSK9 и Asp374Tyr PCSK9.

**[416]** Способы, раскрытые в настоящем документе, предпочтительно применяются для лечения или профилактики заболеваний, вызванных аномальными уровнями и/или активностью PCSK9. В настоящем изобретении предложен способ лечения аномальных уровней и/или активности PCSK9 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по настоящему изобретению (например, перорального состава, содержащего, например, CIVI

008 и средство для пероральной доставки, такой как SNAC, C10 или 5-CNAC, его производное, его фармацевтически приемлемый гидрат, сольват или соль или любую их комбинацию) субъекту.

**[417]** Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению (например, к пероральному составу, содержащему, например, CIVI 008 и средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC, его производное, его фармацевтически приемлемый гидрат, сольват или соль или любую их комбинацию) для применения в качестве лекарственного средства.

**[418]** Настоящее изобретение также относится к применению терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению (например, пероральный состав, содержащий, например, CIVI 008 и средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC, его производное, его фармацевтически приемлемый гидрат, сольват или соль или любую их комбинацию) для производства лекарственного средства для лечения аномальных уровней PCSK9 и/или активности PCSK9 и/или экспрессии мутантных форм PCSK9 (например, мутант с приобретением функции), аллельных вариантов PCSK9 или сплайс-вариантов PCSK9.

**[419]** В настоящем изобретении предложен способ лечения заболевания или состояния, вызванного аномальными уровнями экспрессии и/или активности PCSK9 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению (например, пероральный состав, содержащий, например, CIVI 008 и средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC, его производное, его фармацевтически приемлемый гидрат, сольват или соль или любую их комбинацию) субъекту, при этом введение фармацевтической композиции снижает уровень PCSK9 в сыворотке и/или снижает уровень холестерина ЛПНП в сыворотке у субъекта. В некоторых аспектах, заболевание или состояние выбирают из группы, состоящей из атеросклероза, гиперхолестеринемии, дисбаланса холестерина ЛПВП/ЛПНП, дислипидемии, САД и СНО. В некоторых аспектах, дислипидемия представляет собой FCHL или приобретенную гиперлипидемию. В некоторых аспектах, гиперхолестеринемия представляет собой наследственную гиперхолестеринемию или резистентную к статинам гиперхолестеринемию. В некоторых аспектах, субъект или пациент, который нуждается в лечении, является субъектом или пациентом, страдающим или, вероятно, страдающим от заболевания или расстройства, раскрытых в настоящем документе.

**[420]** В некоторых примерах термин «лечение», используемый в настоящем документе, относится как к лечению существующего заболевания, например, заболевания или расстройства, описанного в настоящем документе, так и к предупреждению заболевания, т.е. профилактике. Таким образом, в некоторых аспектах, указанное в настоящем документе лечение может быть профилактическим.

**[421]** В некоторых аспектах, лечение фармацевтической композицией по настоящему изобретению (например, пероральный состав, содержащий, например, CIVI 008 и средство для пероральной доставки, такой как SNAC, C10 или 5-CNAC, его производное, его фармацевтически приемлемый гидрат, сольват или соль или любую их комбинацию) может лечить, облегчать или ингибировать симптомы заболевания, описанного в настоящем документе. В некоторых аспектах, лечение фармацевтической композицией по настоящему изобретению (например, пероральный состав, содержащий, например, CIVI 008 и средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC, его производное, его фармацевтически приемлемый гидрат, сольват или его соль, или любую их комбинацию) могут предотвращать, отсрочивать или облегчать последствия, связанные с заболеванием, описанным в настоящем документе.

**[422]** Например, в некоторых аспектах, введением фармацевтической композиции по настоящему изобретению (например, перорального состава, содержащего, например, CIVI 008 и средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC, его производное, его фармацевтически приемлемый гидрат, сольват или соль или любую комбинацию) могут лечить гиперхолестеринемию у субъекта. В некоторых аспектах, введение фармацевтической композиции по настоящему изобретению (например, перорального состава, содержащего, например, CIVI 008 и средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC, его производное, его фармацевтически приемлемый гидрат, сольват или соль или любую их комбинацию) может ингибировать развитие гиперхолестеринемии у субъекта, подверженного риску. В некоторых аспектах, введение фармацевтической композиции по настоящему изобретению (например, перорального состава, содержащего, например, CIVI 008 и средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC, его производное, его фармацевтически приемлемый гидрат, сольват или соль или любую их комбинацию) может отсрочить начало гиперхолестеринемии у субъекта из группы риска. В некоторых аспектах, введение фармацевтической композиции по настоящему изобретению (например, перорального состава, содержащего, например, CIVI 008 и средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC, его производное, его фармацевтически приемлемый гидрат,

сольват или соль или любую их комбинацию) может ингибировать развитие гиперхолестеринемии у субъекта, подверженного риску. В некоторых аспектах, введение фармацевтической композиции по настоящему изобретению (например, перорального состава, содержащего, например, CIVI 008 и средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC, его производное, его фармацевтически приемлемый гидрат, сольват или соль или любую их комбинацию) может ингибировать или задерживать начало или развитие симптомов гиперхолестеринемии у субъекта, например, боль в груди при активности, ксантомы (жировые отложения часто обнаруживаются в сухожилиях и на локтях, ягодицах и коленях), ксантелазмы (отложения холестерина вокруг век), дуга роговицы (серо-белые отложения холестерина вокруг роговицы) и др. В некоторых случаях аспекты, введение фармацевтической композиции по настоящему изобретению (например, пероральный состав, содержащий, например, CIVI 008 и средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC, его производное, его фармацевтически приемлемый гидрат, сольват или соль или любую их комбинацию) может ингибировать или задерживать начало или развитие последствий или осложнений гиперхолестеринемии у субъекта, например, болезни сердца, сердечно-сосудистых заболеваний, сердечных приступов, длительного атеросклероза, инсульта и т. д.

**[423]** В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, вызванного аномальными уровнями экспрессии и/или активности PCSK9 у нуждающегося в этом субъекта, например, гиперхолестеринемии, включающему введение эффективного количества перорального состава (например, в форме таблетки или капсулы), содержащих CIVI 008 и средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC, его производное, его фармацевтически приемлемый гидрат, сольват или соль или любую их комбинацию, субъекту, при этом введение фармацевтической композиции снижает уровень PCSK9 в сыворотке и снижает уровень холестерина ЛПНП в сыворотке у субъекта. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способу лечения гиперхолестеринемии у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение эффективного количества перорального состава (например, в форме таблетки или капсулы), содержащего CIVI 008 и средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC субъекту, при этом введение фармацевтической композиции снижает уровень PCSK9 в сыворотке и снижает уровень холестерина ЛПНП в сыворотке у субъекта. В некоторых аспектах, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения гиперхолестеринемии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества перорального

состава (например, в форме таблетки или капсулы), содержащего CIVI 008 и SNAC, при этом введение фармацевтической композиции снижает уровень PCSK9 в сыворотке и снижает уровень холестерина ЛПНП в сыворотке у субъекта. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способу лечения гиперхолестеринемии у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества перорального состава (например, в форме таблетки или капсулы), содержащего CIVI 008 и C10, при этом введение фармацевтической композиции снижает уровень PCSK9 в сыворотке и снижает уровень холестерина ЛПНП в сыворотке у субъекта.

[424] В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способу лечения гиперхолестеринемии у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества перорального состава (например, в форме таблетки или капсулы), содержащего CIVI 008 и 5-CNAC, при этом введение фармацевтической композиции снижает уровень PCSK9 в сыворотке и снижает уровень холестерина ЛПНП в сыворотке у субъекта.

## **V. Комбинированное лечение**

[425] В некоторых аспектах, фармацевтические композиции по настоящему изобретению (например, пероральные составы, содержащие, например, CIVI 008 и средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC, его производное, его фармацевтически приемлемый гидрат, сольват или соль или любую их комбинацию) можно использовать в комбинированном лечении с другим терапевтическим средством. В некоторых аспектах, дополнительное терапевтическое средство можно вводить совместно как часть одной и той же фармацевтической композиции, например, в качестве дополнительного компонента одной и той же таблетки или капсулы. В некоторых аспектах, дополнительное терапевтическое средство можно вводить совместно отдельно, т. е. фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят, например, в виде таблетки или капсулы, а дополнительный компонент вводят, например, в другой таблетке или капсуле.

[426] Дополнительные терапевтические агенты, которые можно вводить совместно с фармацевтическими композициями по настоящему изобретению, включают, например, ингибиторы редуктазы ГМГ-КоА, такие как статины, например, широко используемые при лечении метаболического заболевания (см. WO 2009/043354, которая полностью

включена в настоящий документ посредством ссылки для примеров комбинированного лечения).

**[427]** Терапевтические средства, которые можно вводить совместно с фармацевтическими композициями по настоящему изобретению, могут представлять собой другие соединения, снижающие уровень холестерина, такие как соединение, выбранное из группы, состоящей из:

- (i) смолы, связывающие соли желчных кислот (например, холестирамин, колестипол и гидрохлорид колесевелама);
- (ii) ингибиторы HMGCoA-редуктазы (например, ловастатин, церивастатин, правастатин, аторвастатин, симвастатин, розувастатин и флувастатин);
- (iii) никотиновая кислота;
- (iv) производные фибриновой кислоты (например, клофибрат, гемфиброзил, фенофибрат, безафибрат и ципрофибрат);
- (v) пробукол;
- (vi) неомицин;
- (vii) декстротироксин;
- (viii) сложные эфиры растительного станола,
- (ix) ингибиторы абсорбции холестерина (например, эзетимиб);
- (x) имплитапид;
- (xi) ингибиторы переносчиков желчных кислот (например, апикальные натрий-зависимые переносчики желчных кислот);
- (xii) регуляторы печеночного CYP7a;
- (xiii) заместительная терапия эстрогеном (например, тамоксифен);
- (xiv) противовоспалительные средства (например, глюкокортикоиды); и,
- (xv) любая их комбинация.

**[428]** В одном аспекте совместная терапия включает таблетку или капсулу для перорального введения, содержащую пероральную фармацевтическую композицию по настоящему изобретению (например, пероральные составы, содержащие, например, CIVI 008 и средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC, его производное, его фармацевтически приемлемый гидрат, сольват или соль или любую их комбинацию) и статин. В одном из аспектов, сопутствующая терапия включает таблетку или капсулу для перорального введения, содержащую (i) CIVI 008, (ii) средство для пероральной доставки, такое как SNAC, C10 или 5-CNAC, его производное, его фармацевтически приемлемый гидрат, сольват или соль или любую их комбинацию, и (iii)

статинов. В одном из аспектов, совместная терапия включает таблетку или капсулу для перорального введения, содержащую (i) CIVI 008, (ii) SNAC и (iii) статинов. В одном аспекте совместная терапия включает таблетку или капсулу для перорального введения, содержащую (i) CIVI 008, (ii) C10 и (iii) статинов. В одном из аспектов, совместная терапия включает таблетку или капсулу для перорального введения, содержащую (i) CIVI 008, (ii) 5-CNAC и (iii) статинов.

## **VI. Композиции контролируемого высвобождения**

[429] В некоторых аспектах, пероральные фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат компоненты для облегчения прохождения через желудок и верхний отдел кишечника, например, энтеросолюбильные покрытия, pH-чувствительные материалы и ингибиторы ферментов. В некоторых аспектах, пероральные фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут также содержать желатин, например, в качестве покрытия или агента, повышающего вязкость.

[430] Энтеросолюбильное (гастростойкое) покрытие, например, полимер, может быть таким, который будет растворяться в кишечном соке при уровне pH выше, чем в желудке, например, уровень pH более 4,5, например, в тонком кишечнике, и, следовательно, позволяют высвобождать активное вещество в областях тонкого кишечника, а не в верхней части желудочно-кишечного тракта. В одном аспекте энтеросолюбильное вещество начинает растворяться в водном растворе при уровне pH от около 4,5 до около 5,5. В другом аспекте энтеросолюбильное вещество быстро растворяется в водном растворе при уровне pH около 5. В другом аспекте энтеросолюбильное вещество быстро растворяется в водном растворе при уровне pH около 5,5.

[431] Подходящие кишечнорастворимые (гастрорезистентные) материалы включают, но не ограничиваются ими, сшитый поливинилпирролидон; несшитый поливинилпирролидон; фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, сукцинат ацетат гидроксипропилметилцеллюлозы, сукцинат ацетат целлюлозы; фталат ацетат целлюлозы, сукцинат ацетат гидроксипропилметилцеллюлозы, тримеллитат ацетат целлюлозы; фталат ацетат крахмала; фталат поливинилацетата; карбоксиметилцеллюлоза; фталат метилцеллюлозы; сукцинат метилцеллюлозы; сукцинат фталат метилцеллюлозы; полуэфир метилцеллюлозы и фталевой кислоты; сукцинат этилцеллюлозы; карбоксиметиламид; сополимер дивинилбензола метакрилата калия; поливиниловые спирты; полиоксиэтиленгликоли; полиэтиленгликоль; альгинат натрия; галактоманнан; карбоксиполиметилен; карбоксиметилкрахмал натрия; сополимеры акриловой кислоты

и/или метакриловой кислоты с мономером, выбранным из следующих: метилметакрилат, этилметакрилат, этилакрилат, бутилметакрилат, гексилметакрилат, децилметакрилат, лаурилметакрилат, фенилметакрилат, метилакрилат, изопропилакрилат, изобутилакрилат, или октадецилакрилат, например серии EUDRAGIT™-L и -S, включая L 100-55, L 30 D-55, L 100, S 100, L 12,5 и S 12,5, доступны от Evonik Industries; поливинилацетат; жиры; масла; воски; жирные спирты; шеллак; зеин; глютен; сополимер этилакрилата и ангидрида малеиновой кислоты; сополимер ангидрида малеиновой кислоты и винилметилового эфира; сополимер стирола и малеиновой кислоты; ангидрид малеиновой кислоты 2-этилгексилакрилата; сополимер кротоновой кислоты и винилацетата; сополимер глутаминовой кислоты/эфира глутаминовой кислоты; монооктаноат глицерина карбоксиметилэтилцеллюлозы; полиаргинин; поли(этилен); поли(пропилен); полиэтиленоксид; полиэтилентерефталат); поли(винилизобутиловый эфир); поливинил хлорид); и полиуретан.

**[432]** Также можно использовать комбинацию энтеросолюбильных материалов. В некоторых аспектах, энтеросолюбильное вещество быстро растворяется при уровне pH 5,5 и выше, обеспечивая быстрое растворение в верхних отделах кишечника. Например, энтеросолюбильное вещество может быть выбрано из сополимера метакриловой кислоты и метилметакрилата и сополимера метакриловой кислоты и этилакрилата. Например, энтеросолюбильным полимером является сополимер метакриловой кислоты и этилакрилата 1:1 (EUDRAGIT™ L 30 D-55 и EUDRAGIT™ L 100-55).

**[433]** Другие подходящие примеры энтеросолюбильных покрытий включают пчелиный воск и глицерилмоностеарат; пчелиный воск, шеллак и целлюлоза; и цетиловый спирт, мастика и шеллак, а также шеллак и стеариновая кислота; поливинилацетат и этилцеллюлоза; и нейтральный сополимер сложных эфиров полиметакриловой кислоты (EUDRAGIT™ L 30D); сополимеры метакриловой кислоты и метилового эфира метакриловой кислоты или нейтральный сополимер сложных эфиров полиметакриловой кислоты, содержащий стеараты металлов. Такие покрытия включают смеси жиров и жирных кислот, шеллака и производных шеллака и фталатов целлюлозных кислот, например, содержание свободные карбоксильные группы.

**[434]** Как известно в данной области техники, к энтеросолюбильным полимерам можно добавить один или более пластификаторов для повышения их пластичности и снижения хрупкости. Подходящие пластификаторы включают, например, бутилцитраты, триэтилцитрат, диэтилфталат, дибутилсебагинат, полиэтиленгликоли (ПЭГ, такие как ПЭГ 6000), ацетилтриэтилцитрат и триацетин. В одном из аспектов, пластификатор

представляет собой триэтилцитрат. В то время как некоторые энтеросолюбильные материалы являются гибкими и не требуют пластификаторов, более хрупкие полимеры (например, типы EUDRAGIT™ L/S, EUDRAGIT™ RL/RS и EUDRAGIT™ FS 30 D) выигрывают от пластификаторов, например, в диапазоне от 5 мас. % и 30 мас. % в расчете на массу сухого полимера, от около 8 мас. % до около 12 мас. % триэтилцитрата с поли(метакриловая кислота соэтилакрилат) 1:1.

**[435]** В некоторых аспектах, энтеросолюбильные покрытия содержат один или несколько агентов, препятствующих склеиванию (антиадгеренты) для снижения липкости пленки и предотвращения агломерации, как это известно в данной области техники. Агенты, препятствующие склеиванию, включают, но не ограничиваются ими, тальк, глицерилмоностеарат, пирогенный диоксид кремния (например, AEROSIL™ 200), осажденный диоксид кремния (например, SIPERNAT™ PQ) и стеарат магния. Агенты, препятствующие склеиванию, можно использовать в любом подходящем количестве, например, в диапазоне от около 10 мас. % до 100 мас. % в расчете на массу сухого полимера, от около 10 мас. % до около 50 мас. %, от около 10 мас. % до около 30 мас. % или от около 15 мас. % до около 30 мас. %. Например, в одном аспекте в пределах от 15 мас. % до около 30 мас. % в расчете на массу сухого полимера.

**[436]** Одно или несколько поверхностно-активных веществ также могут быть добавлены в смесь энтеросолюбильного покрытия для повышения смачиваемости субстрата и/или стабилизации суспензий, как это известно в данной области техники. Поверхностно-активные вещества включают полисорбат 80, моноолеат сорбитана и додецилсульфат натрия, а также другие поверхностно-активные вещества, описанные в настоящем документе.

**[437]** Энтеросолюбильное покрытие может быть сформировано любым подходящим способом. Процессы нанесения покрытия включают, например, дражирование, покрытие в псевдооживленном слое и сухое покрытие (например, тепловое сухое покрытие и электростатическое сухое покрытие). Дражирование и покрытие в псевдооживленном слое с использованием растворителя являются хорошо зарекомендовавшими себя процессами. В жидком покрытии энтеросолюбильное вещество и необязательные вспомогательные вещества (например, пигменты, пластификаторы, агенты, препятствующие склеиванию) смешивают с органическим растворителем или водой с образованием раствора или дисперсии. Раствор или дисперсию покрытия распыляют на твердые лекарственные формы в тарельчатой машине для нанесения покрытий или в сушилке с псевдооживленным слоем и сушат горячим воздухом. Например, в процессе нанесения

покрытия с псевдооживленным слоем Вурстера жидкость для нанесения покрытия распыляется снизу аппарата с псевдооживленным слоем. В качестве альтернативы жидкость для нанесения покрытия наносится распылением сверху. В некоторых аспектах, применяют тангенциальное распыление.

**[438]** Количество применяемого энтеросолюбильного материала достаточно для достижения желаемых характеристик кислотостойкости и высвобождения. Например, в одном аспекте количество энтеросолюбильного покрытия соответствует требованиям USP <711> (USP 36-NF 31) для лекарственных форм с отсроченным высвобождением, таким образом, не высвобождается 10,0 мас. % препарата через 2 часа в 0,1 N HCl. В некоторых аспектах, состав высвобождает по меньшей мере 80% активного вещества за 20 минут в буферном растворе с уровнем pH 6,8, например, с использованием метода растворения USP 36-NF 31, раздел <711>.

**[439]** В одном из аспектов, энтеросолюбильное покрытие присутствует в количестве в диапазоне от около 10 % до 40 % или от 25 % до около 35 % при измерении прироста массы по сравнению с ядрами частиц без покрытия или в диапазоне от прироста массы от около 25% до около 31%, прироста массы от около 27% до около 31% или прироста массы от около 28,5% до около 31% в расчете на массу ядер частиц без покрытия.

**[440]** Композиция может включать оболочку капсулы. Известны мягкие и твердые оболочки капсул. В одном из аспектов, оболочка капсулы представляет собой оболочку твердой капсулы, т.е. оболочка желатиновой капсулы или оболочка твердой капсулы на растительной основе. В некоторых аспектах, оболочка капсулы содержит одно или несколько энтеросолюбильных покрытий, описанных в настоящем документе. При ускоренном хранении желатиновые капсулы могут разрушаться. Таким образом, в некоторых аспектах, состав может включать оболочку капсулы из гидроксипропилметилцеллюлозы.

**[441]** Твердые лекарственные формы по настоящему изобретению могут быть получены таким образом, чтобы предотвращать или замедлять расщепление в желудке. Композиции с контролируемым высвобождением, подходящие для использования в настоящем изобретении, могут, например, включать энтеросолюбильное покрытие или могут быть составлены таким образом, чтобы разрушать поверхность.

**[442]** В соответствии с одним из аспектов, твердые лекарственные формы для перорального применения содержат терапевтически эффективное количество пероральной фармацевтической композиции по настоящему изобретению, при этом твердая пероральная лекарственная форма имеет время дезинтеграции от около 250 секунд до

около 650 секунд при пероральном введении. В другом аспекте время дезинтеграции составляет от около 350 до около 550 секунд при пероральном введении. В одном аспекте время дезинтеграции составляет более 60 секунд при пероральном введении. В другом аспекте время дезинтеграции составляет более 400 секунд при пероральном введении. Время дезинтеграции можно определить в воде при  $37\pm 2$  °C с использованием метода, описанного в USP <701>.

**[443]** Твердые лекарственные формы по настоящему изобретению (например, таблетки или капсулы) могут быть покрыты энтеросолюбильным покрытием. Энтеросолюбильное покрытие может служить первичным контролем задержки высвобождения лекарственной композиции или композиций в твердой лекарственной форме. Энтеросолюбильное покрытие остается интактным в желудке и предотвращает или замедляет высвобождение в желудок твердой лекарственной формы. Высвобождение активного агента задерживается до тех пор, пока твердая лекарственная форма не достигнет кишечника. Попадая в кишечник, более высокий уровень pH вызывает высвобождение активного агента. Энтеросолюбильные покрытия включают, но не ограничиваются ими, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, сукцинат ацетат гидроксипропилметилцеллюлозы, фталат поливинилацетата, тримеллитат ацетат целлюлозы, ацетат фталат целлюлозы, поли(метакриловая кислота-этилакрилат) и поли(метакриловая кислота-метилметакрилат). Другие энтеросолюбильные покрытия, которые можно использовать в соответствии с настоящим изобретением, описаны в патенте США № 5851579, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

**[444]** В одном из аспектов настоящего изобретения энтеросолюбильное покрытие наносится на всю таблетку или другую дозированную форму. В одном из аспектов, энтеросолюбильное покрытие наносят на систему, состоящую из множества частиц, такую как система, содержащая микрочастицы и/или наночастицы.

**[445]** Твердые лекарственные формы по настоящему изобретению могут быть сформированы таким образом, чтобы они разрушались с поверхности таблетки (или другой лекарственной формы) или с поверхности системы, состоящей из множества частиц (например, системы, содержащей микрочастицы). Эти составы для поверхностной эрозии медленно растворяются с поверхности, а не распадаются. Контролируя скорость эрозии поверхности, можно отсрочить высвобождение активного агента и лекарственной композиции из твердой лекарственной формы. Препараты для поверхностной эрозии могут быть сформованы таким образом, что существенное высвобождение активных

агентов или лекарственных композиций не происходит до тех пор, пока твердая пероральная лекарственная форма не достигнет кишечника.

**[446]** В некоторых аспектах, твердые лекарственные формы по настоящему изобретению могут также содержать защитный агент, такой как ингибитор нуклеазы. В некоторых аспектах, ингибитор нуклеазы содержит ауринтрикарбоную кислоту. В некоторых аспектах, ингибитор нуклеазы включает ингибитор нуклеазы с широкой специфичностью, такой как РНКзин. В некоторых аспектах, ингибитор нуклеазы включает GS-6620, IDX184, PSI-7777, PSI-938, RG7128, TMC649128 или АВТ-072.

**[447]** В некоторых аспектах, твердые лекарственные формы по настоящему изобретению могут также содержать защитный агент, который предотвращает или уменьшает деградацию фрагмента конъюгата GalNAc. В некоторых аспектах, защитный агент предотвращает или уменьшает отщепление фрагмента конъюгата GalNAc от олигомера. В некоторых аспектах, защитные агенты предотвращают или уменьшают расщепление или деградацию одного или нескольких звеньев N-ацетилгалактозамина в фрагменте GalNAc.

**[448]** В некоторых аспектах, твердые лекарственные формы по настоящему изобретению могут также содержать антацидное соединение. Термин «антацидное соединение» относится к любому фармацевтически приемлемому соединению, способному нейтрализовать желудочную кислоту (например, HCl в водном растворе), предпочтительно, при этом один моль антацидного соединения способен нейтрализовать по меньшей мере 0,5 моль HCl, и более предпочтительно способен нейтрализовать не менее 1 моля HCl. Терапевтически активные агенты (например, CIVI 008 отдельно или в комбинации со вторым агентом, таким как статин), агенты для пероральной доставки (например, SNAC или 5-CNAC) и ингибиторы протеазы, описанные в настоящем документе, исключены из объема фразы «антацидное соединение», даже несмотря на то, что в некоторых вариантах осуществления изобретения они могут проявлять некоторую способность нейтрализовать желудочную кислоту.

**[449]** Примеры антацидных соединений, которые можно использовать в любом из аспектов, описанных в настоящем документе, в отношении одного или нескольких антацидных соединений (в соответствии с любым из аспектов изобретения, описанных в настоящем документе), включают, без ограничения, карбонат кальция, глюконат кальция, цитрат кальция, карбонат натрия, бикарбонат натрия, глюконат натрия, цитрат натрия, гидроксид натрия, карбонат калия, гидрокарбонат калия, глюконат калия, цитрат калия, гидроксид калия, карбонат магния, глюконат магния, цитрат магния, гидроксид магния,

оксид магния, карбонат алюминия, глюконат алюминия, цитрат алюминия и гидроксид алюминия.

**[450]** В некоторых аспектах, твердые лекарственные формы по настоящему изобретению могут также включать ингибитор секреции желудочного сока. Термин «ингибитор секреции желудочной кислоты» относится к любому агенту, который снижает секрецию кислоты в желудке, хотя он не обязательно оказывает какое-либо влияние на уже секретлируемую кислоту. Примеры ингибиторов секреции желудочного сока, которые могут быть использованы в любом из аспектов, описанных в настоящем документе в отношении антацидной композиции, включают, без ограничения, антагонисты H<sub>2</sub>-рецепторов, такие как циметидин, фамотидин, низатидин и ранитидин; и ингибиторы протонной помпы, такие как омепразол, лансопризол, декслансопризол, эзомепразол, рабепразол и илапризол.

**[451]** Твердые лекарственные формы по настоящему изобретению могут также включать агенты, ингибирующие ферменты. Агенты, ингибирующие ферменты, включенные в твердые стандартные лекарственные формы, могут предотвращать распад олигомеров или других активных агентов, которые могут быть чувствительны к ферментативному расщеплению. Агенты, ингибирующие ферменты, описаны в патенте США № 6458383, который включен в настоящий документ посредством ссылки. Выбор и уровни ингибитора фермента основаны на токсичности и силе ингибирования и будут очевидны специалистам в данной области. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что ингибитор может функционировать отдельно или в комбинации как: конкурентный ингибитор, связываясь с сайтом связывания субстрата фермента, тем самым предотвращая доступ к субстрату; неконкурентный ингибитор, который может одновременно связываться с сайтом фермента вместе с субстратом, так как их сайты связывания не идентичны; и/или комплексобразующий агент из-за потери ферментативной активности, вызванный лишением основных ионов металлов из структуры фермента.

**[452]** В одном из аспектов, ингибитор протеазы, включенный в любую из композиций (включая стандартные лекарственные формы композиции), описанных в настоящем документе, содержит по меньшей мере один ингибитор трипсина. В некоторых аспектах, ингибитор протеазы состоит по существу из одного или нескольких ингибиторов трипсина.

**[453]** Примеры ингибитора трипсина, который может быть использован, включают, без ограничения, ингибитор трипсина фасоли лимской, апротинин, ингибитор трипсина сои,

ингибитор трипсина овомукоид и любую их комбинацию. В некоторых аспектах, ингибитор трипсина включает ингибитор трипсина сои (SBTI). В некоторых аспектах, ингибитор трипсина (необязательно по меньшей мере один ингибитор протеазы) состоит по существу из SBTI.

**[454]** В некоторых аспектах, ингибитор протеазы содержит по меньшей мере один серпин. В некоторых аспектах, ингибитор протеазы состоит по существу из одного или нескольких серпинов. Примеры серпинов, которые можно использовать в любом из аспектов, описанных в настоящем документе, включают, без ограничения, альфа-1-антитрипсин, родственный антитрипсину белок, альфа-1-антихимотрипсин, каллистатин, ингибитор протеина С, глобулин, связывающий кортизол, глобулин, связывающий тироксин, ангиотензиноген, центерин, ингибитор протеазы, родственной белку Z, васпин, ингибитор эластазы моноцитов/нейтрофилов, ингибитор активатора плазминогена-2, антиген-1 плоскоклеточной карциномы (SCCA-1), антиген-2 плоскоклеточной карциномы (SCCA-2), маспин, ингибитор протеиназы 6 (PI-6), мегсин, серпин B8 (PI-8), серпин B9 (PI-9), бомапин, юкопин, хурпи/хедпин, антитромбин, кофактор гепарина II, ингибитор активатора плазминогена 1, глиа-производный нексин, фактор пигмента эпителия, альфа-2-антиплазмин, ингибитор комплемента-1, белок теплового шока 47 кДа (HSP47), нейросерпин и панципин.

**[455]** В некоторых аспектах, ингибитор протеазы содержит по меньшей мере один ингибитор цистеиновой протеазы. В некоторых аспектах, ингибитор протеазы состоит по существу из одного или нескольких ингибиторов цистеиновых протеаз. Примеры ингибиторов цистеинпротеазы, которые могут быть использованы в любом из аспектов, описанных в настоящем документе, включают, без ограничения, цистатин типа 1, цистатин типа 2, цистатин человека С, D, S, SN и SA, цистатин E/M, цистатин F и цистатин типа 3 (включая кининогены).

**[456]** В некоторых аспектах, ингибитор протеазы содержит по меньшей мере один ингибитор треонинпротеазы. В некоторых аспектах, ингибитор протеазы состоит по существу из одного или нескольких ингибиторов треонинпротеазы. Примеры ингибиторов треонинпротеазы, которые можно использовать в любом из описанных в настоящем документе аспектов, включают, без ограничения, бортезомиб, MLN-519, ER-807446 и TMC-95A.

**[457]** В некоторых аспектах, ингибитор протеазы содержит по меньшей мере один ингибитор аспарагиновой протеазы. В некоторых аспектах, ингибитор протеазы состоит по существу из одного или нескольких ингибиторов аспарагиновой протеазы. Примеры

ингибиторов аспарагиновой протеазы, которые можно использовать в любом из аспектов, описанных в настоящем документе, включают, помимо прочего,  $\alpha$ 2-макроглобулин, пепстатин А, ингибитор аспарагиновой протеазы 11, ингибитор аспарагиновой протеазы 1, ингибитор аспарагиновой протеазы 2, ингибитор аспарагиновой протеазы 3, ингибитор аспарагиновой протеазы 4, ингибитор аспарагиновой протеазы 5, ингибитор аспарагиновой протеазы 6, ингибитор аспарагиновой протеазы 7, ингибитор аспарагиновой протеазы 8, ингибитор аспарагиновой протеазы 9, ингибитор пепсина Dit33 и ингибитор 3 протеазы А.

**[458]** В некоторых аспектах, ингибитор протеазы содержит по меньшей мере один ингибитор металлопротеазы. В некоторых аспектах, ингибитор протеазы состоит по существу из одного или нескольких ингибиторов металлопротеазы. Примеры ингибиторов металлопротеаз, которые можно использовать в любом из аспектов, описанных в настоящем документе, включают, без ограничения, пептид, ингибирующий ангиотензин-1-превращающий фермент, антигеморрагический фактор ВJ46а, бета-казеин, ингибитор протеиназы CeKI, ингибитор яда металлопротеиназы DM43, ингибитор карбоксипептидазы А, smpl, IMPI, щелочная протеиназа, латексин, ингибитор карбоксипептидазы, антигеморрагический фактор HSF, тестикан-3, SPOCK3, TIMP1, ингибитор металлопротеиназы 1, ингибитор металлопротеиназы 2, TIMP2, ингибитор металлопротеиназы 3, TIMP3, ингибитор металлопротеиназы 4, TIMP4, предполагаемый ингибитор металлопротеиназы tag-225, тканевый ингибитор металлопротеазы, WAP, ингибитор казал, иммуноглобулин и белок 1, содержащий домен Кунитца и NTR.

**[459]** Примеры ингибиторов протеазы, которые можно использовать в любом из аспектов, описанных в настоящем документе, также включают, без ограничения, AEBSF-HCl,  $\epsilon$ -аминокапроновую кислоту,  $\alpha$ 1-антихимотипсин, антипаин, антитромбин III,  $\alpha$ 1-антитрипсин, APMSF (4-амидинофенилметансульфонилфторид), спротинин, бензамидин, химостатин, DFP (диизопропилфторфосфат), лейпептин, гидрохлорид 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонилфторида, PMSF (фенилметилсульфонилфторид), TLCK (1-хлор-3-тозиламида-7-амино-2-гептанон), TPCK (1-хлор-3-тозиламида-4-фенил-2-бутанон), изотионат пентамидаина, пепстатин, гуанидиум,  $\alpha$ 2-макроглобулин, хелатирующий агент цинка и йодоацетат.

**[460]** В некоторых аспектах, таблетка или капсула могут быть покрыты pH-чувствительным покрытием, чтобы они не растворялись при низком уровне pH желудка. Например, вещества, чувствительные к уровню pH, не растворяются в значительной степени до тех пор, пока лекарственная форма не покинет желудок. Уровень pH тонкого

кишечника постепенно увеличивается от около 4,5 до около 6,5 в луковице двенадцатиперстной кишки до около 7,2 в дистальных отделах тонкого кишечника (подвздошной кишке). Для обеспечения прогнозируемого растворения, соответствующего времени транзита по тонкому кишечнику, равного около 3 часам (например, 2-3 часа), и обеспечения воспроизводимого высвобождения в ней покрытие должно начинать растворяться в диапазоне уровня рН двенадцатиперстной кишки и продолжать растворяться при уровне рН тонкого кишечника. Таким образом, количество (толщина) энтеросолюбильного покрытия должно быть достаточным для его существенного растворения в течение около трехчасового транзита в тонком кишечнике (например, в проксимальном и среднем отделах тонкого кишечника).

**[461]** В некоторых аспектах, фармацевтическая лекарственная форма по настоящему изобретению высвобождает активное(ые) соединение(я) в тонком кишечнике, например, в терминальном отделе тонкого кишечника, субъекта, например, человека, за счет особой конструкции рН-чувствительного покрытия. Покрытие в значительной степени разлагается и/или растворяется в тонком кишечнике путем специального выбора энтеросолюбильного покрытия, которое предпочтительно выбирают из рН-чувствительных полимеров, существенно разлагающихся и/или растворяющихся при значении уровня рН от около 5,5 до около 7,5, предпочтительно от около 7,2 до около 7,3. Такие полимеры, чувствительные к уровню рН, предпочтительно выбирают из гидроксипропилметилцеллюлозы (также называемой в дальнейшем «гипромеллоза») и анионных сополимеров метакриловой кислоты и метакрилметакрилата. В некоторых аспектах, чувствительное к уровню рН энтеросолюбильное покрытие, содержащее или изготовленное из гидроксипропилметилцеллюлозы, представляет собой ацетат сукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы. Коммерчески доступным продуктом такого типа является AQOAT®, например, AQOAT®-HF (Shin-Etsu Chemical Co., Chiyoda, Japan). В других аспектах типа анионных сополимеров метакриловой кислоты и метакрилметакрилата также могут быть использованы различные формы полимеров EUDRAGIT®. EUDRAGIT® коммерчески доступен от Evonik Healthcare & Nutrition GmbH, Essen, Germany. В некоторых аспектах, EUDRAGIT® FS30D используется в качестве рН-чувствительного полимера покрытия или, по меньшей мере, его части.

**[462]** В дополнительных аспектах изобретения различные покрытия могут наноситься в комбинации. Согласно одному из аспектов, покрытие содержит или изготовлено из комбинации гидроксипропилметилцеллюлозы и анионного сополимера метакриловой кислоты и метакрилметакрилата. В некоторых аспектах, применяется комбинация

покрытий, так что обычно внутреннее покрытие из одного рН-чувствительного полимера наносится в качестве первого слоя, а покрытие из второго рН-чувствительного полимера наносится на внутреннее покрытие в качестве второго слоя. Например, рН-чувствительное покрытие может включать внутреннее покрытие из гидроксипропилметилцеллюлозы или содержащее, соответственно, в качестве первого слоя, и второе покрытие, содержащее или состоящее из анионного сополимера метакриловой кислоты и метакрилметакрилата, обеспечиваемое в качестве второго слоя на субпокрытие. В еще одном аспекте покрытие фармацевтической пероральной лекарственной формы по изобретению включает покрытие, включающее первый слой (субпокрытие), содержащий или изготовленный из анионного полимера метакриловой кислоты и метакрилата, такого как EUDRAGIT®, например, EUDRAGIT® FS30D, и второй слой, содержащий или изготовленный из гидроксипропилметилцеллюлозы, такой как AQOAT®, более предпочтительно AQOAT®-HF. Более предпочтительно, анионный сополимер метакриловой кислоты и метакрилметакрилата, например, EUDRAGIT®, такой как EURDRAGIT® FS30D, присутствует в меньшем количестве, чем гидроксипропилметилцеллюлоза, такая как AQOAT®, например, AQOAT®-HF. Другими словами, толщина первого слоя этого типа комбинации меньше, чем толщина второго слоя в этой комбинации. Более конкретно, отношение количества или толщины, соответственно, между первым слоем и вторым слоем обычно составляет от около 1:10 до около 1:50, например, от около 1:20 до около 1:30.

**[463]** В одном из аспектов настоящего изобретения предложены конкретные фармацевтические лекарственные формы, описанные выше, которые имеют малый размер, предпочтительно менее 3 мм в наибольшем измерении, более предпочтительно от около 0,6 мм до около 1,7 мм в наибольшем измерении. Такие малые лекарственные формы могут удобно принимать форму гранул или пилюль. Преимущество малых лекарственных форм по изобретению заключается в том, что они ведут себя подобно жидкости в желудке субъекта, вызывая быстрое и постоянное поступление фармацевтической пероральной дозированной формы по изобретению в кишечный тракт и, следовательно, более равномерно транспортируют ее к целевому взрывному высвобождению в тонком кишечнике субъекта, предпочтительно в терминальной части (т.е. дистальный отдел) тонком кишечнике субъекта.

**[464]** В других аспектах настоящего изобретения также может быть удобно, чтобы фармацевтическая пероральная лекарственная форма имела больший размер, т.е. формы, в которых наибольший размер лекарственной формы составляет около 3 мм или более,

причем верхний предел размера удобно выбирается специалистом в данной области таким образом, чтобы лекарственная форма могла хорошо проглатываться субъектом. Типичным диапазоном фармацевтических пероральных лекарственных форм по изобретению являются лекарственные формы, имеющие наибольший размер от около 3 до около 10 мм. Следует понимать, что этот диапазон включает все целые числа в мм, а именно, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 мм, а также любые их части.

**[465]** Желатин представляет собой смесь очищенных белковых фракций, которую можно получить путем частичного гидролиза животного коллагена кислотой или щелочью. Процесс кислотного гидролиза относится к типу А, а процесс щелочного гидролиза к типу В. Желатин представляет собой линейный полимер, состоящий из аминокислот, молекулярная масса которых может варьироваться от 15000 до 250000. Используемый в настоящем документе термин «желатин» включает кислотные и щелочные гидролизаты коллагена животного происхождения.

**[466]** Желатин можно применять в композициях по настоящему изобретению для выполнения многих функций, таких как покрытие, суспендирующий агент, связующее вещество для таблеток и/или в качестве агента, повышающего вязкость. В воде желатин набухает и размягчается и может поглощать в 5-10 раз больше воды, чем его собственный вес. В некоторых аспектах, вместо желатина можно применять несколько гидрофильных природных и синтетических полимеров. Например, (а) анионные полимеры, такие как альгиновая кислота, сульфат декстрана или пектин; (б) катионные кислоты, такие как хитозан или полилизин; (в) амфифатические полимеры, такие как карбоксиметилхитин или фибрин; или (г) нейтральные полимеры, такие как декстран, агароза или пуллулан.

**[467]** Используемый в настоящем документе термин «желатин» включает желатин и его альтернативы, раскрытые в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980), страница 1245 и страницы 1576-1582, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Термин «желатин» также включает композиции, раскрытые в патенте США № № 6090915, патент США № 4043996, патент США № 4064008, патент США № 4176117, патент США № 4889920, патент США № 4374063, патент США № 5210182, патент США № 4232425, патент США № 4402873, патент США № 4427583, патент США № 5093474, патент США № 5288408 и патент США № 5459241, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

**[468]** Термин «желатин», используемый в настоящем документе, также включает заменители и альтернативы желатина. Как правило, такая альтернатива желатину может

быть изготовлена из легкодоступных (например, растительных) материалов, имеющих однородный состав и обладающих всеми основными характеристиками желатина. При изготовлении мягких гелевых пленок и капсул мягкая гелевая композиция предпочтительно обладает такими свойствами, как хорошая прочность влажной и сухой пленки, нерастворимость в холодной воде, масле и спирте, растворимость в горячей воде, сворачиваемость при температуре и давлении, прозрачность пленки, пленкообразующая способность, гибкость, съедобность, инертность к лекарственным средствам или другим материалам, подлежащим инкапсулированию, и быстрое отвердевание из горячей жидкости с образованием геля.

**[469]** Одна из альтернатив желатину представляет собой пленкообразующую композицию, которая содержит крахмальный материал, выбранный из модифицированного крахмала и воскообразного крахмала; смолу; и пластификатор, как описано в патенте США № 6375981, который включен в настоящий документ посредством ссылки. Модифицированный крахмал или воскообразный крахмал предпочтительно имеет эквивалент декстрозы (DE) менее около 1 и, более предпочтительно, не имеет измеримого DE. Эта композиция может, но не обязательно, быть на 100% свободной от желатина. Таким образом, композицию можно использовать в качестве заменителя желатина или в качестве наполнителя в желатиновых препаратах.

**[470]** Другой альтернативой желатину является гель пшеничных волокон, раскрытый в патенте США № 6440480, который включен в настоящий документ посредством ссылки. Гель пшеничных волокон производится путем термической/физической обработки пшеничных волокон. Для обработки пшеничного материала используется специальная технология помола, в результате чего получается продукт, содержащий большую долю мелкодисперсных частиц. Конкретные улучшения достигаются при смешивании продукта с мальтодекстрином. Полученный таким образом продукт продается под торговой маркой VITACEL® от FMC Biopolymer, Филадельфия, Пенсильвания. Этот продукт представляет собой сухой порошок, который легко диспергируется в воде. При перемешивании дисперсии за счет сил сдвига образуется гель. Сообщается, что гель пшеничных волокон можно использовать в качестве заменителя желатина в йогурте или мороженом. (I. I. Bollinger, Food Marketing & Techn. October 1995, 4-6).

**[471]** Каррагинан является еще одной альтернативой желатину. Каррагинан это природный гидроколлоид, полисахаридный гидроколлоид, получаемый из морских водорослей. Он включает углеводный полимер из повторяющихся сахарных звеньев, который является линейным, без значительного количества разветвлений или замен.

## Примеры

[472] Олигонуклеотиды синтезировали на уридиновых универсальных носителях с использованием фосфорамидитного подхода на синтезаторе EXPEDITE™ 8900/MOSS (система синтеза множества олигонуклеотидов) или OLIGOMAKER™ 48 в масштабе 4 мкмоль или 1 мкмоль, соответственно. По окончании синтеза олигонуклеотиды отщепляли от твердого носителя водным раствором аммиака в течение 5-16 часов при 60 °С. Олигонуклеотиды очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (ОФ-ВЭЖХ) или с помощью твердофазной экстракции и характеризовали с помощью ВЭЖХ, а молекулярную массу дополнительно подтверждали с помощью ЭСИ-МС. Подробности смотрите ниже.

[473] **Удлинение олигонуклеотида:** связывание  $\beta$ -цианоэтилфосфорамидитов (ДНК-A(Bz), ДНК-G(ibu), ДНК-C(Bz), ДНК-T, LNA-5-метил-C(Bz), LNA-A(Bz), LNA-G(dmf), LNA-T или линкер С6-S-S-С6) проводили с использованием раствора 0,1 М 5'-О-DMT-защищенного амидита в ацетонитриле и ДЦИ (4,5-дицианимидазол) в ацетонитриле (0,25 М) в качестве активатора. Для заключительного цикла использовали коммерчески доступный С6-связанный фосфорамидит холестерина в концентрации 0,1 М в ДХМ. Тиолирование для введения фосфоротиоатных связей проводили с использованием гидрида ксантана (0,01 М в ацетонитрил/пиридин 9:1). Фосфодизфирные связи вводили с использованием 0,02 М йода в смеси ТГФ/пиридин/вода 7:2:1. Остальные реагенты были реагентами, обычно используемыми для синтеза олигонуклеотидов. Для конъюгации после твердофазного синтеза в последнем цикле твердофазного синтеза использовали коммерчески доступный фосфорамидитный амиолинкер С6, и после удаления защиты и отщепления от твердой подложки выделяли аминосвязанный незащищенный олигонуклеотид. Конъюгат вводили путем активации функциональной группы стандартными методами синтеза.

[474] **Очистка с помощью ОФ-ВЭЖХ:** Неочищенные соединения очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ на колонке PHENOMENEX™ JUPITER® C18 10 мкм 150×10 мм. В качестве буферов использовали 0,1 М ацетат аммония, уровень pH 8, и ацетонитрил при скорости потока 5 мл/мин. Собранные фракции лиофилизировали с получением очищенного соединения, как правило, в виде белого твердого вещества.

[475] **Сокращения:** ДЦИ (4,5-дицианимидазол), ДХМ (дихлорметан), ДМФА (диметилформамид), ДМТ (4,4'-диметокситритил), ТГФ (тетрагидрофуран), Bz (бензоил), Ibu (изобутирил), ОФ-ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой)

[476] Синтезированные соединения показаны на ФИГ. и в таблицах настоящего изобретения.

### Пример 1

#### Исследование нового мотива, нацеленного на PCSK9

[477] Был сконструирован и синтезирован 521 антисмысловый олигонуклеотид анти-PCSK9 - все с тремя замкнутыми нуклеиновыми кислотами, фланкирующими десять ДНК, т.е. с 16-мерным гэпмером LNA, специфичным для PCSK9 человека и приматов. Линию клеток человека 15PC3 инкубировали в течение трех дней либо с имитацией, либо с олигонуклеотидами, модифицированными замкнутыми нуклеиновыми кислотами, нацеленными на человеческий PCSK9, в концентрации 0,3 мкМ. Каждый олигонуклеотид анти-PCSK9 тестировали в трех независимых экспериментах. Уровни мРНК PCSK9 количественно определяли из выделенной РНК с использованием ПЦР в реальном времени, как описано, и представляли нормализованными к мРНК  $\beta$ -актина и относительными средними уровнями в двенадцати образцах, подвергнутых имитации, на ФИГ. 8, с крупным планом подгруппы наиболее сильнодействующих молекул на ФИГ. 9.

### Пример 2

#### Нокдаун мРНК *in vitro*

[478] Линию клеток человека 15PC3 инкубировали в течение 3 дней либо с псевдо, либо с модифицированными олигонуклеотидами с замкнутыми нуклеиновыми кислотами с SEQ ID NO: 1-8, нацеленными на PCSK9 человека в концентрациях 0,0012 мкМ, 0,06 мкМ, 0,3 мкМ и 1,5 мкМ. Уровни мРНК PCSK9 количественно определяли из выделенной РНК с использованием ПЦР в реальном времени, как описано, и представляли относительно средних уровней в четырех образцах, обработанных имитациями, на ФИГ. 10. Для каждого олигонуклеотида эффективность, количественно выраженная как половина максимальной эффективной концентрации ( $EC_{50}$ ), определялась методом наименьших квадратов уравнения Хилла в двухпараметрической логистической форме с нижним пределом, зафиксированным на уровне 0%, и верхним пределом, зафиксированным на уровне 100%, как  $EC_{50}$  = оценка  $\pm$  стандартное отклонение.

### Пример 3

#### Уровни аланинаминотрансферазы АЛТ *in vivo*

[479] Самкам мышей NMRI в возрасте четырех недель (Таконик, Дания), весом около 20 г при поступлении, однократно вводили внутривенно либо физиологический раствор,

либо модифицированные олигонуклеотиды с замкнутыми нуклеиновыми кислотами, конъюгированные с холестерином, с SEQ ID 9-16, нацеленные на PCSK9 человека в дозах 7,5 и 15 мг/кг. Мышей умерщвляли через 7 дней после введения и определяли уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ) в сыворотке с использованием ферментативного анализа (Horiba ABX Diagnostics). Для каждой лечебной группы из пяти мышей рассчитывали средние и стандартные отклонения, которые представлены на ФИГ. 11 относительно средних уровней у мышей, которым вводили физиологический раствор. Повышение АЛТ было отмечено при обеих концентрациях для некоторых, но не для всех молекул, конъюгированных с холестерином. Некоторые из соединений, такие как SEQ ID NO: 9 и 10, не повышали АЛТ у мышей клинически значимым образом, даже когда холестерин использовали в качестве конъюгата для усиления поглощения соединений в печени.

#### **Пример 4**

##### **Исследование приматов**

**[480]** Основная цель этого исследования заключалась в исследовании выбранных липидных маркеров в течение 7 недель после однократной медленной болюсной инъекции соединений LNA анти-PCSK9 яванским макакам и оценке потенциальной токсичности соединений у обезьян. Соединения, использованные в этом исследовании, представляли собой SEQ ID NO: 10, 13, 18, 19, 20 и 21, приготовленные в стерильном физиологическом растворе (0,9%) при начальных концентрациях 0,625 мг/мл и 2,5 мг/мл.

**[481]** Использовали самцов обезьян в возрасте по меньшей мере 24 месяцев, которым давали свободный доступ к водопроводной воде и 180 г расширенного рациона MWM(E) SQC SHORT (Dietex France, SDS, Saint Gratien, France) ежедневно раздавали животным. Общее количество корма, раздаваемого в каждой клетке, рассчитывали по числу животных, находившихся в клетке в этот день. Кроме того, каждому животному ежедневно давали фруктовые или овощные таблетки. Акклиматизация животных к условиям исследования проводилась не менее чем за 14 дней до начала периода лечения. В этот период были проведены предварительные исследования. Животным вводили SEQ ID NO: 10, 13, 18 и 21, внутривенно (в/в) в разовой дозе 0,25 мг/кг, 1,0 мг/кг или 2,5 мг/кг, или в разовой дозе 1,0 мг/кг, мг/кг или 2,5 мг/кг для SEQ ID NO: 19 и 20, соответственно. Объем дозы составлял 0,4 мл/кг. На группу использовали двух (2) животных.

**[482]** Лекарственные формы вводили однократно в День 1. За животными наблюдали в течение периода 7 недель после лечения и выписывали из исследования на День 51. День

1 соответствовал первому дню периода лечения. Клинические наблюдения, массу тела и потребление пищи (на группу) регистрировали до и во время исследования.

**[483]** Отбирали пробы крови и анализы выполняли в следующие моменты времени:

День исследования	Параметры
-8	RCP, L, Apo-B, PCSK9*, OA
-1	L, Apo-B, PCSK9*, PK, OA
1	Введение
4	LSB, L, Apo-B, PCSK9*, OA
8	LSB, L, Apo-B, PCSK9*, PK, OA
15	RCP, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
22	LSB, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
29	L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
36	LSB, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
43	L, PK, Apo-B, PCSK9* PK, OA
50	RCP, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA

**[484]** RCP означает обычную клиническую патологию, LSB означает биохимию безопасности печени, PK означает фармакокинетику, OA означает другой анализ и L означает липиды. Параметры, определяемые для всех выживших животных в указанных случаях, включали: полную биохимическую панель (полный список ниже) в дни -8, 15 и 50, безопасность печени (только ASAT, ALP, ALAT, TBIL и GGT) в дни 4, 8, 22 и 36, и липидный профиль (общий холестерин, ХС-ЛПВП, ХС-ЛПНП и триглицериды) и только Апо-В - в дни -1, 4, 8, 22, 29, 36 и 43. Кровь (приблизительно 1,0 мл) в пробирки с литий-гепарином (с помощью биохимического анализатора крови ADVIA 1650): Апо-В, натрий, калий, хлориды, кальций, неорганический фосфор, глюкоза, ХС-ЛПВП, ХС-ЛПНП, мочевины, креатинин, общий билирубин (ОБЛ), общий холестерин, триглицериды, щелочная фосфатаза (ЩФ), аланинаминотрансфераза (АЛАТ), аспартатаминотрансфераза (АСАТ), креатинкиназа, гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ), лактатдегидрогеназа, общий белок, альбумин, соотношение альбумин/глобулин.

**[485]** **Анализ PCSK9 в крови:** Образцы крови для анализа PCSK9 собирали в дни -8, -1, 4, 8, 15, 22, 29, 36, 43 и 50. Отбирали венозную кровь (около 2 мл) из соответствующей вены каждого животного в пробирку для отделения сыворотки (SST) и оставляли для свертывания в течение не менее  $60 \pm 30$  минут при комнатной температуре. Кровь центрифугировали при 1000 g в течение 10 минут в условиях охлаждения (настроено на поддержание  $+4^{\circ}\text{C}$ ). Сыворотку переносили в 3 отдельные пробирки и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до анализа в CitoxLAB France с использованием метода ELISA (набор Circulex Human PCSK9 ELISA, CY-8079, валидирован для образцов яванского макака).

**[486] Другой анализ:** WO 2011009697 предоставляет способы количественной ПЦР и анализа мРНК PCSK9. Другие анализы включают ELISA белка PCSK9, анализ Lp(a) сыворотки с помощью ELISA (Merckodia № 10-1106-01), анализ олигонуклеотидов в тканях и плазме (содержание наркотиков), экстракцию образцов (стандартные образцы и образцы для контроля качества) и определение содержания олигонуклеотидов методом ELISA.

**[487]** Значения экспрессии PCSK9 по сравнению со значениями до введения дозы, наблюдаемыми после введения соединений, представленных SEQ IS NO: 10, 13, 18, 19, 20 и 21, показаны в следующей таблице:

Значение для дозы 2,5 мг/кг				
Соединение SEQ ID	Белок PCSK9 на 4 день (процент от предшествующей дозы)	Белок PCSK9 на 29 день (процент от предшествующей дозы)	Максимальное действие PCSK9 (данные представляют процент от предшествующей дозы)	Максимальное действие ЛПНП-Х (данные представляют процент от предшествующей дозы)
10	86%	71,5%	69% (д15)	87% (д29)
13	81%	71%	71% (д29)	84% (д22)
18	57%	42%	42% (д29)	71% (д15)
21	80,5%	56%	55% (д29)	84% (д15)
20	51%	53%	48% (д4)	94% (д8)
19	55%	60%	55% (д4)	89% (д4)

**[488]** Не было признаков гепатотоксичности или нефротоксичности соединений, нацеленных на PCSK9. Примечательно, что соединения PCSK9-GalNAc давали быстрое и высокоэффективное понижающее регулирование PCSK9, которое поддерживалось в течение длительного периода времени (в течение всего исследования), что свидетельствует о том, что соединения, конъюгированные с GalNAc, были более эффективными как с точки зрения быстрого начального нокдауна, так и большей продолжительности, что указывает на то, что их можно вводить сравнительно редко и в более низкой дозе по сравнению как с неконъюгированными исходными соединениями, так и с соединениями, использующими альтернативную технологию конъюгации, такую как конъюгация с холестерином. Тем не менее, нокдаун также наблюдался при введении неконъюгированных олигомеров. Таким образом, оба типа соединений могут иметь различное терапевтическое применение. Например, неконъюгированные соединения могут быть использованы, когда желателен временный эффект, или, например, как часть

лоидной дозы. И наоборот, конъюгированные олигомеры можно вводить, когда необходим долгосрочный эффект.

[489] SEQ ID NO: 18 давала быструю и последовательную понижающую регуляцию PCSK9 и ЛПНП-Х на протяжении всего исследования (наблюдали на 34-й день при дозе 2,5 мг/кг, при этом снижение активности PCSK9 без лечения наблюдалось через 48 дней после введения) однократной дозы 2,5 мг/кг, при которой уровень белка PCSK9 в плазме составлял 71% от предшествующей дозы).

### Пример 5

#### Оценка токсичности для печени и почек у крыс.

[490] Соединения по настоящему изобретению оценивали на предмет их профиля токсичности у грызунов. Wistar Han CrI:WI(Han) использовали в возрасте около 8 недель. В этом возрасте самцы весили около 250 г. Все животные имели свободный доступ к гранулированному поддерживающему рациону SSNIFF R/M-H (SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) и водопроводной воде (отфильтрованной через фильтр 0,22 мкм), содержащейся в бутылках. Использовали уровни доз 10 мг/кг/доза и 40 мг/кг/доза (подкожное введение) и вводили в дни 1 и 8. Животных подвергали эвтаназии на 15 день. Образцы мочи и крови собирали на 7 день и 14. Оценку клинической патологии проводили на 14-й день. Массу тела определяли до исследования, в первый день введения и за 1 неделю до вскрытия. Потребление пищи в группе оценивали ежедневно. Образцы крови брали через хвостовую вену после 6 часов голодания. Были проведены следующие анализы сыворотки крови: количество эритроцитов, средний объем клеток, гемоглобин, средняя концентрация гемоглобина в клетках, количество тромбоцитов, количество лейкоцитов, дифференциальное количество лейкоцитов с морфологией клеток, количество ретикулоцитов, натрий, калий, хлорид, кальций, неорганический фосфор, глюкоза, мочевины, креатинин, общий билирубин, общий холестерин, триглицериды, щелочная фосфатаза, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, общий белок, альбумин и соотношение альбумин/глобулин.

[491] Также проводили анализ мочи. Измеряли следующие параметры:  $\alpha$ -GST,  $\beta$ -2 микроглобулин, кальбиндин, кластерин, цистатин С, KIM-1, остеопонтин, TIMP-1, VEGF и экспрессию NGAL. Семь аналитов (кальбиндин, кластерин, GST- $\alpha$ , KIM-1, остеопонтин, TIMP-1 и VEGF) были количественно определены в соответствии с панелью 1 (MILLIPLEX® MAP Rat Kidney Toxiness Magnetic Bead Panel 1, RKTIX1MAG-37K). Три аналита (микроглобулин  $\beta$ -2, цистатин С, липокалин-2/NGAL) были количественно

определены в соответствии с панелью 2 (MILLIPLEX® MAP Rat Kidney Toxiness Magnetic Bead Panel 2, RKTХ2MAG-37K). Анализы для определения концентраций этих биомаркеров в моче крыс были основаны на технологии Luminex xMAP®. Микросферы, покрытые антителами против  $\alpha$ -GST/ $\beta$ -2-микроглобулина/кальбиндина/кластерина/цистациона C/KIM-1/остепонтина/TIMP-1/VEGF/NGAL, окрашивали двумя разными флуоресцентными красителями. Белок мочи и креатинин мочи также определяли в моче на приборе ADVIA 1650. Также определяли количественные параметры, а именно: объем, уровень pH (с помощью тест-полосок 10-Multistix SG/анализатор мочи Clinitek 500), удельный вес (с помощью рефрактометра). Полуколичественные показатели (с использованием тест-полосок 10-Multistix SG/анализатор мочи Clinitek 500): белки, глюкоза, кетоны, билирубин, нитриты, кровь, уробилиноген, цитология осадка (при микроскопическом исследовании). Также определялись качественные параметры, такие как внешний вид и цвет.

**[492]** После умерщвления определяли массу тела и массу почек, печени и селезенки и рассчитывали отношение массы органа к массе тела. Образцы почек и печени были взяты и либо заморожены, либо сохранены в формалине. Проведен микроскопический анализ.

**[493]** Данные по экспрессии KIM-1 (биомаркера повреждения ткани почек) показаны на **ФИГ. 15**. Данные показывают, что все молекулы, кроме SEQ ID NO: 4, имели более низкий сигнал kIM-1 в моче, чем SEQ ID NO: 1 (SPC5001), демонстрируя улучшенную безопасность для почек по сравнению с оригинальной и ранее охарактеризованной неконъюгированной молекулой. Отсутствие почечной токсичности наблюдалось как у неконъюгированных олигомеров SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, так и у их соответствующих конъюгированных с GalNAc форм SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19, что указывает на отсутствие почечной токсичности из-за присутствия GalNAc. Таким образом, данные показывают, что увеличение длины SEQ ID NO: 1 (SPC5001) на два азотистых основания неожиданно устраняет почечную токсичность. На самом деле, специалист в данной области ожидал бы противоположного эффекта, поскольку добавление двух дополнительных оснований увеличивало силу взаимодействия между олигомером и целевым сайтом.

### Пример 6

#### Анализ расщепляемых линкеров

[494] Меченые FAM (амидит флуоресцеина) антисмысловые олигомеры (АСО) с различными ДНК/РО-линкерами подвергали расщеплению *in vitro* либо в экстракте нуклеазы S1 (таблица ниже), либо в гомогенатах печени или почек, либо в сыворотке.

№	Seq (5'-3')	Расщепляемый линкер	Конъюгат (С)
35	GCattggtatTCA	3РО-ДНК (5'tca3')	FAM
36	GCattggtatTCA	2РО-ДНК (5'ca3')	FAM
37	GCattggtatTCA	1РО-ДНК (5'a3')	FAM
38	GCattggtatTCA	3РО-ДНК (5'gac3')	FAM
39	GCattggtatTCA	нет	FAM

[495] Заглавные буквы обозначают нуклеозиды LNA (такие как бета-D-окси LNA), строчные буквы обозначают нуклеозиды ДНК. Нижний индекс s представляет тиофосфатные межнуклеозидные связи. Цитозины LNA необязательно представляют собой 5-метилцитозин. Фрагмент конъюгата FAM показан на **ФИГ. 6**, а конъюгированные молекулы показаны на **ФИГ. 7**.

[496] Меченые FAM АСО 100 мкМ с различными ДНК/РО-линкерами подвергали расщеплению *in vitro* нуклеазой S1 в нуклеазном буфере (60 ед. на 100 мкл) в течение 20 и 120 минут (А). Ферментативную активность останавливали добавлением ЭДТА в буферный раствор. Затем растворы подвергали анализу методом АПЕ ВЭЖХ на Dionex Ultimate 3000 с использованием колонки Dionex DNArac p-100 и градиента от 10 мМ до 1 М перхлората натрия при уровне рН 7,5. Содержание расщепленного и нерасщепленного олигонуклеотида определяли относительно стандарта с использованием как флуоресцентного детектора при 615 нм, так и УФ-детектора. детектор на 260 нм.

SEQ ID NO	Последовательность линкера	Процент расщепления после 20 мин S1	Процент расщепления после 120 мин S1
39	-	2	5
37	a	29,1	100
36	ca	40,8	100
35	tca	74,2	100
38	gac	22,9	н.о.

[497] РО-линкеры (или область В, как упоминается в настоящем документе) приводили к расщеплению части конъюгата (или группы С). Как длину, так и/или состав последовательности линкера можно использовать для модулирования восприимчивости к нуклеолитическому расщеплению области В. Выбор последовательности для ДНК/РО-линкера мог модулировать скорость расщепления, как это видно через 20 минут в нуклеазе S1 экстракта выбранных последовательностей для области В (например, для ДНК/РО-линкера). Таким образом, подбор определенной последовательности ДНК/ПО-линкера можно также использовать для модулирования уровня расщепления в сыворотке и в клетках целевых тканей.

[498] В гомогенаты печени и почек и сыворотку добавляли олигомер SEQ ID NO: 35 до концентрации 200 мкг/г ткани. Образцы печени и почек, собранные у мышей NMRI, гомогенизировали в буфере для гомогенизации (0,5% Igepal CA-630, 25 mM Трис, уровень pH 8,0, 100 mM NaCl, уровень pH 8,0, доведенный до 1 N NaOH). Гомогенаты инкубировали в течение 24 часов при 37 °С, после чего гомогенаты экстрагировали смесью фенол-хлороформ. Содержание расщепленного и нерасщепленного олигомерного конъюгата в экстракте из печени и почек и в сыворотке определяли относительно стандарта с использованием описанного выше метода ВЭЖХ.

Seq ID	Последовательность линкера	% расщепления после 24 ч в гомогенате печени	% расщепления после 24 ч в гомогенате почки	% расщепления после 24 ч в сыворотке
35	tca	83	95	0

[499] Присутствие РО-линкеров (или области В, как упоминается в настоящем документе) вызывало отщепление фрагмента конъюгата (или группы С) в гомогенатах печени или почек, но не в сыворотке. Восприимчивость к расщеплению в анализах, показанных в Примере 6, можно использовать для определения того, является ли линкер биорасщепляемым или физиологически лабильным. Расщепление в приведенных выше анализах относится к расщеплению только расщепляемого линкера; т. е. олигомер или область А должны оставаться функционально интактными (т. е. не должны подвергаться деградации).

### Пример 7

#### Нокдаун мРНК PCSK9 конъюгатами холестерина *in vivo*

**[500]** Мышам NMRI инъекцировали одну дозу физиологического раствора или 10 мг/кг неконъюгированного LNA-антисмыслового олигонуклеотида (SEQ ID NO: 40), или эквимоллярные количества LNA-антисмысловых олигонуклеотидов, конъюгированных с холестерином с различными линкерами, и умерщвляли на 1-10 дни согласно

№	Seq (5'-3') (A)	Расщепляемый линкер (B)	Конъюгат (C)
40	GTctgtggaaGCG	нет	нет
41	GTctgtggaaGCG	нет	Холестерин
42	GTctgtggaaGCG	2РО-ДНК (5'ca3')	Холестерин
43	GTctgtggaaGCG	2РО-ДНК (5'ct3')	Холестерин

**[501]** РНК выделяли из печени и почек и подвергали количественной ПЦР с PCSK9-специфичными праймерами и зондом для анализа нокдауна мРНК PCSK9. Результаты показаны на **ФИГ. 14**.

**[502]** Холестерин, конъюгированный с антисмысловым олигонуклеотидом PCSK9 LNA с линкером, состоящим из 2 ДНК с фосфодиэфирным остовом (SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 43), показал усиленный нокдаун PCSK9 в печени (**ФИГ. 14**) по сравнению с неконъюгированным соединением (SEQ ID NO: 40), а также по сравнению с конъюгатами холестерина со стабильным линкером (SEQ ID NO: 41).

#### Материалы и методы:

**[503]** Схема эксперимента:

Часть	Группа №	Животное №	Кол. животных	Штамм животного / пол/корм	Доза соединения в день	Конц, В дозе об, 10 мл/кг	Путь введения	День введения	Масса тела в день	День умерщвления
А	1	1-3	3	NMRI/♀/ Chow	Физ. Раст.	–	вв	0	0,1	1
	2	4-6	3	NMRI/♀/ Chow	SEQ ID NO 40 10 мг/кг	1 мг/мл	вв	0	0,1	1
	3	7-9	3	NMRI/♀/ Chow	SEQ ID NO 41 эквимолляр 11,3 мг/кг	1,13 мг/мл	вв	0	0,1	1
	5	13-15	3	NMRI/♀/ Chow	SEQ ID	1,27	вв	0	0,1	1

Часть	Группа №	Животное №	Кол. животных	Штамм животного / пол/корм	Доза соединения в день	Конц, В дозе об, 10 мл/кг	Путь введения	День введения	Масса тела в день	День умерщвления
				ow	NO 42 эквимоляр 12,7 мг/кг	мг/мл				
	6	16-18	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 43 эквимоляр 12,7 мг/кг	1,27 мг/мл	вв	0	0,1	1
B	7	19-21	3	NMRI/♀/Chow	Физ. Раст.	–	вв	0	0,3	3
	8	22-24	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 40 10 мг/кг	1 мг/мл	вв	0	0,3	3
	9	25-27	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 41 эквимоляр 11,3 мг/кг	1,13 мг/мл	вв	0	0,3	3
	11	31-33	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 42 эквимоляр 12,7 мг/кг	1,27 мг/мл	вв	0	0,3	3
	12	34-36	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 43 эквимоляр 12,7 мг/кг	1,27 мг/мл	вв	0	0,3	3
C	13	37-39	3	NMRI/♀/Chow	Физ. Раст.	–	вв	0	0,7	7
	14	40-42	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 40 10мг/кг	1 мг/мл	вв	0	0,7	7
	15	43-45	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 41 эквимоляр 11,3 мг/кг	1,13 мг/мл	вв	0	0,7	7
	17	49-51	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 42 эквимоляр 12,7 мг/кг	1,27 мг/мл	вв	0	0,7	7
	18	52-54	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 43 эквимоляр 12,7 мг/кг	1,27 мг/мл	вв	0	0,7	7
D	19	55-57	3	NMRI/♀/Chow	Физ. Раст.	–	вв	0	0,7, 10	10
	20	58-60	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 40	1 мг/мл	вв	0	0,7, 10	10

Часть	Группа №	Животное №	Кол. животных	Штамм животного / пол/корм	Доза соединения в день	Конц, В дозе об, 10 мл/кг	Путь введения	День введения	Масса тела в день	День умерщвления
					10 мг/кг	л				
	21	61-63	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 41 эквимоляр 11,3 мг/кг	1,13 мг/мл	вв	0	0,7, 10	10
	24	70-72	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 42 эквимоляр 12,7 мг/кг	1,27 мг/мл	вв	0	0,7, 10	10
A	25	73-75	3	NMRI/♀/Chow	Физ. Раст.	–	вв	0	0,1	1

**[504] Введение дозы:** Самкам животных NMRI, приблизительно 20 г по прибытии, вводили дозу 10 мл на кг массы тела (в соответствии с массой тела в день 0) внутривенно соединения по настоящему изобретению, приготовленного в физиологическом растворе или только в физиологическом растворе в соответствии с приведенной выше таблицей.

**[505] Отбор образцов ткани печени и почек:** Животных анестезировали смесью 70% CO<sub>2</sub> - 30% O<sub>2</sub> и умерщвляли путем смещения шейных позвонков. Половину большей доли печени и одну почку измельчали и погружали в РНКлатер.

**[506]** Тотальную РНК экстрагировали максимум из 10 мг ткани, гомогенизированной путем измельчения гранул в присутствии тканевого буфера MagNA Pure LC RNA Isolation Tissue (Roche, кат. № 03 604 721 001) с использованием набора MagNa Pure 96 Cellular RNA Large Volume Kit. (Roche, кат. № 5467535001) в соответствии с инструкциями производителя.

**[507]** Синтез первой цепи выполняли с использованием реагентов обратной транскриптазы от Ambion в соответствии с инструкциями производителя.

**[508]** Для каждого образца 0,5 мкг общей РНК доводили до (10,8 мкл) водой без РНКазы, смешивали с 2 мкл случайных декамеров (50 мкМ) и 4 мкл смеси дНТФ (2,5 мМ каждого дНТФ) и нагревали до 70 °С в течение 3 минут, после чего образцы быстро охлаждали на льду.

**[509]** К каждому образцу добавляли 2 мкл 10х буфера RT, 1 мкл обратной транскриптазы MMLV (100 ЕД/мкл) и 0,25 мкл ингибитора РНКазы (10 ЕД/мкл) с последующей инкубацией при 42 °С в течение 60 минут, инактивировали нагреванием

фермента при 95 °С в течение 10 минут, а затем образец охлаждали до 4 °С. Образцы кДНК разбавляли 1:5 и подвергали ОТ-КПЦР с использованием Taqman Fast Universal PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems кат. № 4364103) и анализу экспрессии гена Taqman (mPCSK9, Mn00463738\_m1 и mActin № 4352341E) в соответствии с протоколом производителя и обрабатывали в приборе Applied Biosystems RT-qPCR (7500/7900 или ViiA7) в быстром режиме.

### Пример 8

#### Исследование приматов; множественные подкожные (п/к) инъекции

**[510]** Цель этого исследования на приматах, отличных от человека, заключалась в оценке эффективности и безопасности соединений анти-PCSK9, раскрытых в настоящем документе, в условиях повторного введения, когда соединения вводили путем подкожной инъекции (п/к). Соединения, использованные в этом исследовании, представляли собой SEQ ID NO: 2, 3, 18 и 19, приготовленные в стерильном физиологическом растворе (0,9%) при начальной концентрации 0,625 и 2,5 мг/мл.

**[511]** Использовали самок яванских макак в возрасте по меньшей мере 24 месяцев, которым давали свободный доступ к водопроводной воде и 180 г расширенного рациона OWM(E) SQC SHORT (Dietex France, SDS, Saint Gratien, France) ежедневно раздавали каждому животному. Кроме того, каждому животному ежедневно давали фруктовые или овощные таблетки. Акклиматизация животных к условиям исследования проводилась не менее чем за 14 дней до начала периода лечения. В этот период были проведены предварительные исследования.

**[512]** Животным вводили подкожно один раз в неделю в течение четырех недель в дозе 0,5 мг/кг (SEQ ID NO: 2, 3, 18 и 19) или 1,5 мг/кг/инъекцию (SEQ ID NO: 18 и 19), всего четыре инъекции в течение четырех недель. Объем дозы составлял 0,4 мл/кг/инъекцию. В каждой группе использовали шесть животных. После четвертой и последней дозы животных наблюдали в течение недели, после чего половину животных умерщвляли для изучения регуляции транскрипции apoB печени, параметров липидов, гистологии печени и почек и распределения в ткани печени и почек. День 1 соответствовал первому дню периода лечения. Клинические наблюдения, массу тела и потребление пищи (на группу) регистрировали до и во время исследования.

**[513]** Образцы крови и тканей отбирали и анализировали в моменты времени, указанные в таблице ниже.

День исследования	Параметры
-10	L, Apo-B, OA

День исследования	Параметры
-5	LSB, L, Аро-В, ОА
-1	RCP, L, Аро-В, РК, ОА
1	Введение
8 до введения	LSB, L, Аро-В, РК, ОА
8	Введение
15 до введения	LSB, L, Аро-В, РК, ОА
15	Введение
22 до введения	LSB, L, Аро-В, РК, ОА
22	Введение
29	RCP, РК, ОА + вскрытие
36 (восстановление животных)	LSB, L, Аро-В, РК, ОА
43 (восстановление животных)	RCP, РК, Аро-В, РК, ОА
50 (восстановление животных)	LSB, L, Аро-В, РК, ОА
57 (восстановление животных)	LSB, L, Аро-В, РК, ОА
64 (восстановление животных)	LSB, L, Аро-В, РК, ОА
71 (восстановление животных)	LSB, L, Аро-В, РК, ОА
78 (восстановление животных)	RCP, L, Аро-В, РК, ОА + вскрытие

**[514]** RCP означает обычную клиническую патологию, LSB означает биохимию безопасности печени, РК означает фармакокинетику, ОА означает другие анализы и L означает липиды. Кровь (приблизительно 1,0 мл) отбирали в пробирки с литий-гепарином и определяли натрий, калий, хлорид, кальций, неорганический фосфор, глюкозу, ХС-ЛПВП, ХС-ЛПНП, мочевины, креатинин, общий билирубин (ТБИЛ), общий холестерин, триглицериды, щелочные фосфатазу (АЛП), аланинаминотрансферазу (АЛАТ), аспаратаминотрансферазу (АСАТ), креатинкиназу, гамма-глутамилтрансферазу (ГГТ), лактатдегидрогеназу, общий белок, альбумин и соотношение альбумин/глобулин анализировали с помощью биохимического анализатора крови ADVIA 1650. .

**[515] Анализ крови:** Образцы крови для анализа АроВ отбирали только у животных группы 1-16 (т.е. у животных, получавших соединения анти-АроВ) в дни -8, -1, 4, 8, 15, 22, 29, 36, 43 и 50. Венозную кровь (приблизительно 2 мл) отбирали из соответствующей вены каждого животного в пробирку для отделения сыворотки (SST) и оставляли для свертывания в течение по меньшей мере  $60 \pm 30$  минут при комнатной температуре. Кровь центрифугировали при 1000 g в течение 10 минут в условиях охлаждения (настроено на поддержание  $+4^{\circ}\text{C}$ ). Сыворотку переносили в 3 отдельные пробирки и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до анализа белка АроВ методом ELISA.

**[516] Другой анализ:** WO 2010142805 предоставляет способы количественной ПЦР и анализа мРНК АроВ. Другой анализ включал анализ Lp(a) сыворотки с помощью ELISA (Merckodia № 10-1106-01), анализ олигонуклеотидов в тканях и сыворотке (содержание

лекарственного средства), извлечение образцов, стандартных и контрольных образцов и определение содержания олигонуклеотидов с помощью ELISA.

**[517]** Предполагаемой фармакологией олигонуклеотида против PCSK9 является снижение уровня холестерина ЛПНП за счет снижения количества белка PCSK9 в циркуляции («сывороточный PCSK9»). Хотя, как неконъюгированные, так и конъюгированные формы проявляли фармакологическое действие, конъюгированные молекулы GalNAc продемонстрировали повышенную эффективность по сравнению с неконъюгированными молекулами при изучении как сывороточного PCSK9, так и холестерина ЛПНП (**ФИГ. 16** и **ФИГ. 17**).

**[518]** На **ФИГ. 16** показано, что четыре еженедельные инъекции по 0,5 мг/кг/инъекция неконъюгированной SEQ ID NO: 2 оказывали временное воздействие на PCSK9 в сыворотке и холестерин ЛПНП, тогда как конъюгат GalNAc того же гэпмера LNA (SEQ ID NO: 18) оказывал сильное действие и длительное снижающее действие как на сывороточный PCSK9, так и на уровень холестерина ЛПНП. Такая же зависимость была отмечена при сравнении данных для множественных инъекций SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 19 (**ФИГ. 17**), т. е. после введения неконъюгированной молекулы наблюдались преходящие эффекты, а сильное и продолжительное снижение - регуляция сывороточного PCSK9 и холестерина ЛПНП наблюдалась при введении соответствующего конъюгата GalNAc (SEQ ID NO: 19).

**[519]** Эффекты SEQ ID NO: 18 и 19 на сывороточный PCSK9 и холестерин ЛПНП зависели от дозы и имели большую продолжительность действия, при этом сывороточные уровни PCSK9 и холестерина ЛПНП были ниже среднего исходного уровня в течение по меньшей мере семи недель после последней инъекции (последняя инъекция на 22-й день, данные проиллюстрированы для периода восстановления до 71-го дня).

**[520]** Содержание олигонуклеотидов в печени и почках анализировали через неделю после последней инъекции, т.е. на 29-й день исследования. Содержание олигонуклеотидов анализировали с помощью гибридационного ELISA (как описано у Lindholm et al., Mol Ther. 2012 Feb; 20(2):376-81), с использованием SEQ ID NO: 2 для получения стандартной кривой для образцов от животных, получавших SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 18 (т. е. SEQ ID NO: 2, конъюгированная с GalNAc), после контроля отсутствия изменений в результате, если (конъюгированную) SEQ ID NO: 18 использовали для получения стандартной кривой. Таким же образом SEQ ID NO: 3 использовали для получения стандартной кривой для SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 19 (т.е. SEQ ID NO: 2, конъюгированная с GalNAc) после контроля отсутствия различий в результате, если SEQ

ID NO: 19 использовали для построения стандартной кривой для анализа ELISA этих образцов.

Содержание олигонуклеотида в тканях через одну неделю после инъекции					
	Печень (мкг олигонуклеотида/г влажной ткани)		Почки (мкг олигонуклеотида/г влажной ткани)		Соотношение печень\почки
	Среднее	SD	Среднее	SD	
SEQ ID NO 2, 4×0,5 мг/кг	0,260	0,14	30,3	4,8	0,008
SEQ ID NO 18, 4×0,5 мг/кг	3,57	0,61	11,5	2,5	0,310
SEQ ID NO 18, 4×1,5 мг/кг	18,8	1,7	26,8	6,6	0,701
SEQ ID NO 3, 4×0,5 мг/кг	0,149	0,059	38,2	0,72	0,004
SEQ ID NO 19, 4×0,5 мг/кг	2,72	0,69	16,3	1,5	0,167
SEQ ID NO 19, 4×1,5 мг/кг	12,2	3,44	41,2	6,5	0,296

**[521]** Как показано в таблице выше, конъюгация SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO 3 приводила к более высоким соотношениям печени и почек для конъюгированных молекул (SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19), чем для соответствующих неконъюгированных молекул через неделю после последней инъекции, когда животным вводили подкожно раз в неделю в течение четырех недель.

**[522]** Учитывая, что признаки тубулотоксичности были продемонстрированы с другими неконъюгированными молекулами анти-PCSK9 (такими как SEQ ID NO: 1, как показано на ФИГ. 15), и учитывая, что печень является целевым органом для лечения анти-PCSK9, ожидается, что переход к более высокому соотношению печень/почка приведет к повышению безопасности конъюгатов SEQ ID NO: 18 и 19 по сравнению с неконъюгированными SEQ ID NO: 2 и 3. Тем не менее, как показано на ФИГ. 15, хотя данные в приведенной выше таблице указывают на повышенную безопасность конъюгатов SEQ ID NO: 18 и 19, ни SEQ ID NO: 2, ни 3 не вызывали увеличения КИМ-1 и, следовательно, они не были токсичными для почек.

**[523]** Как показано на **ФИГ. 16** и **ФИГ. 18**, SEQ ID NO: 18 и 19 вводили на уровне, соответствующем фармакологии. Клинические биохимические профили тех же животных в период лечения и в фазе выздоровления не показали клинически значимого увеличения параметров безопасности печени или почек.

### Пример 9

**CIVI008: Исследование токсичности и токсикокинетики CIVI 008 при подкожном или пероральном (капсульном) многократном введении на обезьянах *Synomolgus c* использованием SNAC в качестве носителя**

[524] Цели этого исследования заключались в оценке токсичности и обратимости CIVI008, а также в определении фармакологии, экспозиции в плазме и накоплении CIVI008 в целевых органах при ежедневном пероральном введении в виде капсул яванским макакам маврикийского происхождения в течение 42 дней по сравнению с введением подкожным путем один раз в две недели (исследовано ранее). Испытываемое изделие, CIVI008, представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, нацеленный на PCSK9, в состав которого входит салькапрозат натрия [SNAC, 8-[(2-гидроксibenзоил)амино]октаноат натрия], производитель: abcr GmbH, Im Schleht 10, 76187 Карлсруэ, Германия, каталожный номер: AB 304409], который, как было показано ранее, способен повышать пероральную биодоступность пептидов у животных и человека. Цель этого исследования состояла в том, чтобы предоставить информацию о дозировке CIVI 008 в капсулах для дальнейших клинических испытаний на людях. Схематическое описание исследования представлено на **ФИГ. 20**.

**Распределение по группам, дизайн исследования и уровни доз**

Подкожная и пероральная капсула

Группа	Путь введения	Уровень дозы <sup>A, B</sup>	Количество капсул	Дни введения	Количество животных			
					Токсичность		Восстановление	
					Самец	Самка	Самец	Самка
1	Подкожно	3 мг/кг CIVI 008 в DPBS <sup>A</sup>	-	1, 15 & 29	2	2	-	-
2	Пероральная капсула	10 мг CIVI 008/100 мг SNAC	1	Ежедневно x 42	2	2	1	1
3	Пероральная капсула	20 мг CIVI 008/200 мг SNAC	2	Ежедневно x 42	2	2	1	1
4	Пероральная капсула	20 мг CIVI 008	2	Ежедневно x 42	1	1		
5	Пероральная капсула	200 мг SNAC	2	Ежедневно x 42	1	1		
6	Пероральная капсула	0	2	Ежедневно x 42	1	1		

A Животным группы 1 вводили дозу 3 мг/кг CIVI 008 подкожно, используя самую последнюю массу тела каждого животного. Для введения рассчитанную дозу CIVI 008 растворяли в стерильном растворе фосфатно-солевого буфера Дульбекко (DPBS) до объема 1 мл/кг.

B Группам 2-6 животных вводили перорально капсулы, предназначенные для группы, используя либо 1 капсулу (группа 2), либо две капсулы (группы 3-6). Капсулу (капсулы) вводили непосредственно в нижнюю часть желудка с помощью катетера и выталкивали воздухом. Сразу после введения капсулы вводили примерно 5 мл воды для облегчения

---

растворения.

---

**[525] Пероральная капсула:** Капсулы, содержащие CIVI 008 (10 мг)/SNAC (100 мг), были изготовлены в виде однородных сухих смесей, которыми были наполнены твердые желатиновые капсулы размера 4, которые после наполнения были покрыты энтеросолюбильным покрытием. Состав лекарственного препарата CIVI 008 в виде кишечнорастворимой капсулы оправдан, поскольку известно, что лекарственное вещество CIVI 008 чувствительно к кислотной деградации. Инкапсуляция в капсулах размера 4 (длина в закрытом виде 14,3 мм x внешний диаметр 5,05 мм) была выбрана для облегчения прохождения интактной капсулы через пилорический сфинктер обезьяны.

**[526] Результаты фармакокинетики и биораспределения:** Как показано на **ФИГ. 21**, введение животным двух капсул, содержащих 10 мг CIVI 008 и 100 мг SNAC, приводило к измеримым концентрациям CIVI 008 в плазме, при этом среднее значение  $T_{max}$  достигалось в течение 30 минут после введения дозы. В соответствии с тем, что SNAC необходим для поглощения CIVI 008, очень небольшое количество CIVI 008 было отмечено в плазме контрольных животных, получавших одну капсулу, содержащую 20 мг CIVI 008, без носителя SNAC.

**[527]** CIVI 008 представляет собой конъюгированный с GalNac LNA-гэпмер. CIVI 008, обнаруженный в образцах плазмы через 1,5 часа после введения дозы, показал время удерживания исходного соединения в анализах ВЭРХ, демонстрируя, что лекарство всасывается из кишечника в неизменном виде. Образцы из более поздних временных точек показали более широкий пик, указывающий на смесь исходного соединения и метаболитов, т.е. олигонуклеотиды с неполным сахарным фрагментом.

**[528]** При пероральном введении CIVI 008 подвергается эффектам первого прохождения через печень, что из-за присутствия в печени фрагмента GalNac должно приводить к быстрой абсорбции в печени. Таким образом, при дозах ниже абсорбционной способности печени можно ожидать, что большая часть абсорбированного лекарственного средства будет накапливаться в печени, и очень небольшое количество лекарственного средства будет поступать в общую циркуляцию. Это ожидание было подтверждено сравнением между AUC в плазме и концентрациями в печени (измеренными в конце периода

дозирования) в группах ПК (подкожно) и ПО (перорально). В частности, наблюдалось, что AUC в плазме в группе ПК была на 2-3 порядка выше, чем AUC в группах перорального введения (**ФИГ. 22**), в то время как концентрации в печени различались только около на один порядок между группами ПК и ПО (**ФИГ. 23**). Таким образом, при использовании РНК-терапевтических средств для ингибирования мишеней в печени изменение отношения воздействия на плазму/печень при пероральном приеме и подкожном или внутривенном введении дает средства для значительного снижения воздействия на непеченочные ткани/плазменный компартмент и, следовательно, снижению потенциальных проблем безопасности в нецелевых тканях.

**[529] Фармакодинамические результаты:** ежедневный пероральный прием 1 или 2 капсул CIVI 008/SNAC в течение 42 дней приводил к измеримому снижению первичной мишени, PCSK9, обычно отмечаемому через две недели приема. Среднее процентное снижение PCSK9 на 35/42-й день различалось у разных животных, причем у животных с лучшим ответом снижение PCSK9 > 60% по сравнению с исходным уровнем (**ФИГ. 24**). Среднее снижение PCSK9 у контрольных животных (только CIVI 008, только SNAC и пустые капсулы) было сравнительно небольшим, что подтверждает тот факт, что значительное снижение в активных группах было вызвано опосредованной SNAC абсорбцией CIVI 008.

**[530]** PCSK9 негативно регулирует ЛПНП-рецептор клеточной поверхности, который отвечает за импорт холестерина в печень. Таким образом, фармакологическое снижение PCSK9 увеличивает количество рецептора ЛПНП, вызывая увеличение импорта в печень и снижение уровня холестерина ЛПНП в плазме. В соответствии с этой функцией PCSK9 опосредованное CIVI 008/SNAC снижение уровня PCSK9 приводило к измеримому снижению ЛПНП-с, начиная с около 3 недель после введения дозы и стабилизируясь с 4 недели (**ФИГ. 25A**). Снижение ЛПНП-Х у контрольных животных (только CIVI 008, только SNAC и пустые капсулы) колебалось вокруг исходных значений на протяжении всего исследования (**ФИГ. 25B**).

**[531]** Как показано на **ФИГ. 23**, концентрация CIVI 008 в печени снижалась в течение периода восстановления, но все еще присутствовала в измеримых количествах через 3 недели. В соответствии с присутствием лекарственного средства в печени на протяжении всего периода выздоровления уровни ЛПНП в конце введения дозы сохранялись в течение двух недель после введения дозы и еще не полностью возвращались к исходному уровню в конце восстановления (**ФИГ. 26**).

**[532] Результаты токсичности:** исследование проводилось в соответствии со стандартами GLP, и на протяжении всего исследования (до введения дозы, 14-й, 29-й, 42-й день и конец восстановления) отслеживали следующие параметры токсичности: *Гематология:* количество красных кровяных телец (эритроцитов), гемоглобин, гематокрит, средний объем эритроцитов, средний корпускулярный гемоглобин, средний корпускулярный гемоглобин, концентрация, ширина распределения эритроцитов, абсолютное количество ретикулоцитов, количество тромбоцитов, количество лейкоцитов (лейкоцитов), абсолютное количество нейтрофилов, абсолютное количество лимфоцитов, абсолютное количество моноцитов, абсолютное количество эозинофилов, абсолютное количество базофилов, абсолютное количество неокрашенных клеток, мазок крови.

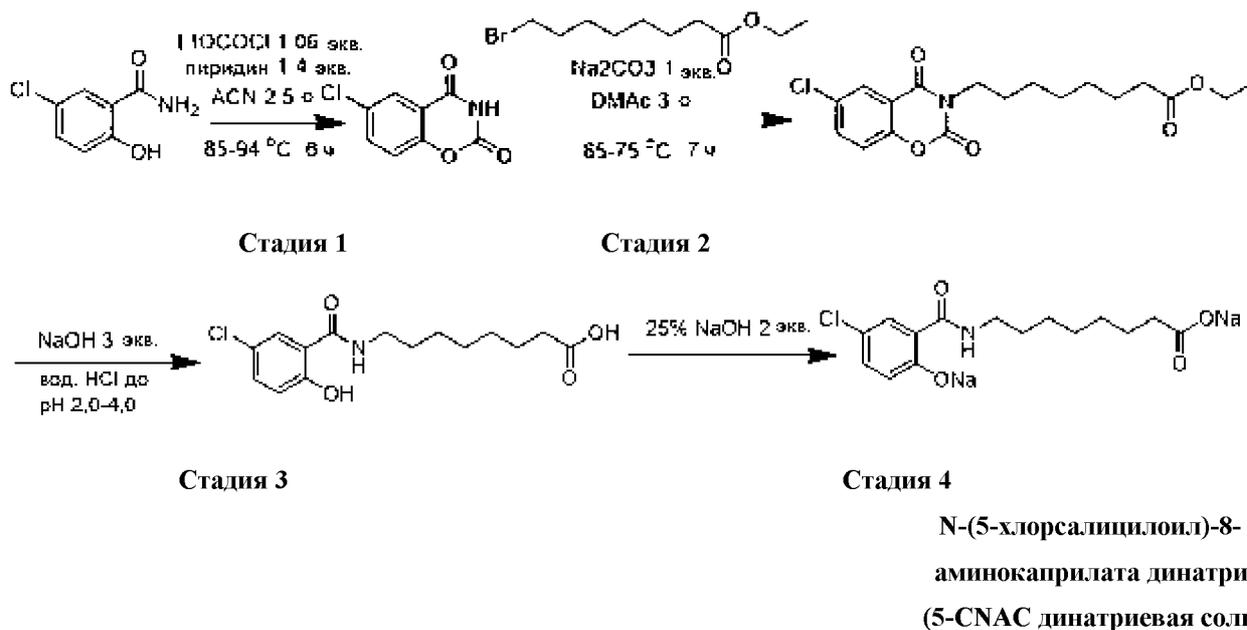
*Клиническая химия, PCSK9 и липиды:* азот мочевины, креатинин, общий белок, альбумин, глобулин, соотношение альбумин:глобулин, общий билирубин, аспаратаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза, щелочная фосфатаза, гамма-глутамилтрансфераза, креатинкиназа, кальций, неорганический фосфор, натрий, калий, хлорид, липопротеины высокой плотности, липопротеины низкой плотности, липопротеины очень низкой плотности, общий холестерин, триглицериды.

**[533]** CIVI 008 приготовленный с SNAC, хорошо переносился без признаков токсикологически значимых клинических наблюдений после введения дозы. Ни у одного из животных во время фазы введения или фазы восстановления не было никаких изменений клинических биохимических параметров или гематологических маркеров.

**[534]** Не было никаких изменений массы органов, которые свидетельствовали бы о действии лекарственного средства после перорального введения капсул. Кроме того, не было обнаружено макроскопических или микроскопических данных, указывающих на местное или системное действие препарата в конце лечения и в конце восстановления. В частности, не было никаких локальных гистопатологических изменений в любом сегменте кишечного тракта (двенадцатиперстной, тонкой, подвздошной и толстой кишке) после перорального приема QD в течение 42 дней, несмотря на то, что во всех сегментах были обнаружены измеримые концентрации CIVI 008.

### Пример 10

#### Получение N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприлата динатрия



**[535] Стадия 1:** 5-хлор-2-гидроксибензамид (30,0 г, 99,9%, 1,0 экв.), ацетонитрил (90 мл, 3 объема), пиридин 19,4 г, 1,403 экв. загружали в реактор и смесь перемешивали при 8-16 °С в течение 10-30 минут. Этилхлорформиат (20,3 г, 1,07 экв.) загружали в реактор при 8-16 °С и реакционную смесь перемешивали при 10-18 °С в течение 30-60 минут. Затем смесь нагревали до температуры кипения с обратным холодильником и перемешивали при 80-90 °С в течение 4 часов. Смесь концентрировали до 3,5 объемов перегонкой при температуре ниже 80-90 °С при пониженном давлении (< 1 бар). Затем в реактор загружали ацетонитрил (45 мл, 1,5 объема), снова концентрировали до 3,5 объема, затем охлаждали до 18-28 °С. Добавляли воду (60 мл, 2 объема) и смесь перемешивали при 18-28 °С в течение 1-3 часов. Смесь охлаждали до 4-8 °С, осадок собирали фильтрованием и осадок промывали водой (30 мл, 1 объем). Влажный осадок сушили при 58 °С в течение 6 часов с получением 6-хлор-2Н-1,3-бензоксазин-2,4(3Н)-диона (31,5 г, чистота 92,6%) с выходом неочищенного продукта 92,6%.

**[536] Стадия 2:** Сухой диметилацетамид (150 мл, 3 объема), гранулированный карбонат натрия (25,1 г, 1,0 эквивалента), 6-хлор-2Н-1,3-бензоксазин-2,4(3Н)-дион (50,0 г, после корректировки после анализа 93,4 мас. %, 1 эквивалент) и этил-8-бромоктаноат (56,8 г, после корректировки после анализа 99,2 мас. %, 0,95 эквивалента) и давление снижали до -0,3 МПа. Затем перемешиваемую смесь нагревали при 70 °С в течение 14 часов. Затем смесь охлаждали до 35-45 °С и собирали осадок фильтрованием. Влажный осадок загружали в реактор, обозначенный как Реактор 1 (R1), фильтрат загружали во второй реактор, обозначенный как Реактор 2 (R2). Этанол (60 мл) загружали в R1 и смесь

влажного осадка и этанола перемешивали при 35-45 °С в течение 10-30 минут. Смесь фильтровали и фильтрат объединяли с уже присутствующим в R2. Содержимое перемешиваемого раствора R2 охлаждали до 25-30 °С и медленно добавляли воду (100 мл, 2 объема) непосредственно в раствор. Смесь охлаждали до 5-10 °С и после выдержки в течение 9,5 часов собирали образовавшийся осадок с получением этил 8-(6-хлор-2Н-1,3-бензоксазин-2,4(3Н)-дионил)октаноата (100 г, чистота 97,5%) в виде влажного осадка.

**[537] Стадия 3:** Воду (240 мл, 3 объема), гидроксид натрия (30 г, 3,3 эквивалента) и этил 8-(6-хлор-2Н-1,3-бензоксазин-2,4(3Н)-дионил)октаноат (83 г, 1,0 эквивалента) загружали в реактор (Реактор 1 (R1)) и перемешивали при 25 °С в течение 10 минут. Перемешиваемую смесь нагревали при 98 °С в течение 3 часов с перегонкой, за это время исходный материал был израсходован. Затем реакционной смеси давали остыть до 27 °С. Воду (240 мл) и HCl (66 мл, 3,5 эквивалента) загружали при перемешивании в соседний реактор (Реактор 2 (R2)) и давали остыть до 20-25 °С. Омыленную реакционную смесь (R1) медленно добавляли к R2 в течение 5 часов, что сопровождалось выделением диоксида углерода и осаждением продукта. Уровень pH смеси доводили до pH 2-3 с помощью 50% раствора гидроксида натрия и перемешивали при 8 °С в течение 3 часов. Продукт собирали фильтрованием, промывали водой и сушили в вакууме с получением N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты (5-CNAC, 63 г, чистота 95,7%) с выходом неочищенного продукта 88,9%.

**[538] Стадия 4:** N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловую кислоту (5-CNAC) (1,0 г, 1,0 эквивалент), гидроксид натрия (0,26 г, 2 эквивалента) и воду (5 мл, 5 объемов) объединяли в реакторе и перемешивали при 55 °С в течение 2 часов. Смеси давали остыть до 20 °С и раствор фильтровали для удаления нерастворимых твердых веществ. Фильтрат концентрировали при температуре ниже 50 °С при пониженном давлении и влажный остаток сушили при 50 °С в течение 12 часов с получением N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприлата динатрия (1,1 г, чистота 97,9%) с выходом неочищенного продукта 96,5%.

### Пример 11

#### **CIVI 008: Пероральное (капсулы) токсикокинетическое исследование CIVI 008 на обезьянах *Сynomolgus* с использованием 5-CNAC в качестве носителя**

**[539]** Цели данного исследования заключались в определении способности 5-CNAC [N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприлата динатрий] способствовать пероральному поглощению CIVI 008, а также в определении способа производства и схемы дозирования капсул CIVI 008/5-CNAC, которые обеспечивают наиболее эффективное пероральное

поглощение CIVI 008 при введении яванским макакам маврикийского происхождения. Цель этого исследования состояла в том, чтобы предоставить информацию о дозировке CIVI008 в капсулах для дальнейших клинических испытаний на людях. Схематический план исследования представлен на **ФИГ. 27**.

**[540] Пероральная капсула:** Было изготовлено несколько различных капсул, как описано ниже.

Группа капсул	CIVI 008 (мг)	5-CNAC (мг)	Способ получения	Размер капсулы
A	10	100	Сухая смесь <sup>1</sup>	4
B	10	100	Сухая смесь <sup>1</sup>	0
C	20	200	Сухая смесь <sup>1</sup>	0
D	5	200	Сухая смесь <sup>1</sup>	0
E	10	200	Сухая смесь <sup>1</sup>	0
F	25	200	Сухая смесь <sup>1</sup>	0
G	30	200	Сухая смесь <sup>1</sup>	0
H	5	200	Сублимация <sup>2</sup>	0
I	10	200	Сублимация <sup>2</sup>	0
J	25	200	Сублимация <sup>2</sup>	0
K	30	200	Сублимация <sup>2</sup>	0

<sup>1</sup>Капсулы с сухой смесью получали из однородных сухих смешанных составов, которыми наполняли либо в i) твердые желатиновые капсулы размера 4 (длина в закрытом виде 14,3 мм x внешний диаметр 5,05 мм) с энтеросолюбильным покрытием после наполнения, либо ii) желатиновые капсулы размера 0 с энтеросолюбильным покрытием с твердой оболочкой (длина в закрытом виде 21,7 мм x внешний диаметр 7,6 мм)

<sup>2</sup>Лиофилизированные капсулы получали путем совместного растворения CIVI 008 и 5-CNAC в [воде] с последующей лиофилизацией и заполнением твердых желатиновых капсул с энтеросолюбильным покрытием размера 0.

**[541] Схема исследования:** В общей сложности 10 обезьян *Сynomolgus* (5 самцов и 5 самок) получали по 2 капсулы группы А в понедельник и среду на 1-й неделе, после чего следовали 4 дня перерыва в дозировании. Эта схема дозирования по понедельникам и средам была продолжена на 2, 3, 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15 и 17 неделях с использованием 2 капсул группы В на один прием на неделе 2 и 1 капсулы групп С-К за дозу в соответствующие недели. В течение периода лечения отбирали образцы крови для фармакокинетического анализа до введения дозы и через 0,5, 1,5, 3 и 5 часов после

введения дозы по понедельникам и средам. Отбирали образцы для клинической химии и гематологии (см. пример 1) до исследования и в конце исследования.

**[542] Фармакокинетические результаты:** Как показано на **ФИГ. 28** введение животным двух капсул группы А приводило к измеримым концентрациям CIVI 008 в плазме, при этом средняя  $T_{max}$  достигалась в течение 30 минут после введения дозы.

**[543]** По сравнению с аналогичной дозой CIVI 008 с использованием SNAC в качестве носителя (Пример 9, **ФИГ. 21**), применение носителя 5-CNAC приводило к увеличению как  $AUC_{0-5}$ , так и  $C_{max}$  (**ФИГ. 29**), что указывает на то, что 5-CNAC является более эффективным из двух носителей в облегчении перорального приема CIVI 008.

**[544]** Капсулы, использованные в исследовании, были покрыты энтеросолюбильным покрытием для облегчения высвобождения CIVI 008/5-CNAC в кишечнике в зависимости от уровня pH. Увеличение размера капсул с размера 4 (группа А) до размера 0 (группа В) не изменило средний фармакокинетический профиль CIVI 008 в плазме или среднее значение  $T_{max}$ , что указывает на то, что капсулы большего размера 0 способны проходить через желудок с той же кинетикой, что и капсулы меньшего 4 размера.

**[545]** При доставке в виде капсулы совместный состав создает высокую локальную концентрацию каждого компонента в месте нахождения в кишечнике, что важно для способности носителя облегчать поглощение комбинированного лекарственного средства. Следовательно, доставка одинакового количества лекарственного средства/носителя в 1 или 2 капсулах может повлиять на эффективность всасывания лекарственного средства. Как показано на **ФИГ. 30**, это так. Хотя кинетика фармакокинетических профилей плазмы была очень схожей, одна капсула, содержащая 20 мг CIVI 008/200 мг 5-CNAC (капсулы группы С), вызывала более высокие  $C_{max}$  и  $AUC_{0-5}$ , чем такое же количество лекарственного средства/носителя, вводимого в 2 капсулах, при этом каждая содержала половину количества лекарственного средства/носителя.

**[546]** Увеличение дозы CIVI 008 при постоянной дозе 5-CNAC пропорционально увеличивало  $AUC$  и  $C_{max}$  дозы до 25 мг. Дальнейшее увеличение дозы приводит к большему, чем пропорциональное дозе, увеличению  $AUC$  и  $C_{max}$ , что указывает на то, что поглощение печенью достигает насыщения (**ФИГ. 31**).

**[547]** Изменение способа получения с сухого смешивания CIVI 008 и 5-CNAC (**ФИГ. 32А**) на совместное растворение CIVI 008 и 5-CNAC с последующей сублимацией (**ФИГ. 32В**), по-видимому, не повлияло на всасывание кишечником препарата CIVI 008. Таким образом, очень похожие профили  $AUC$  и  $C_{max}$  CIVI 008 наблюдались в диапазоне доз от 5 мг до 30 мг, когда капсулы были изготовлены любым способом.

## Пример 12

### **CIVI 008: Пероральное (капсулы) фармакологическое исследование CIVI 008 на обезьянах *Сynomolgus* с использованием 5-CNAC в качестве носителя**

**[548]** Цели этого исследования заключались в определении способности 5-CNAC [N-(5-хоросалицилоил)-8-аминокаприлата динатрия] снижать PCSK9 в плазме при введении один раз в день в течение 7 недель. Период полувыведения CIVI 008 в печени приматов, не являющихся человеком, составляет от 2 до 3 недель, поэтому ожидается, что после 7 недель приема концентрация в печени достигнет >80% от его равновесного уровня.

**[549] Схема исследования:** Капсулы с сухой смесью (20 мг CIVI 008/200 мг 5-CNAC) изготавливали из однородных сухих смешанных составов, которыми наполняли твердые желатиновые капсулы размера 0 с энтеросолюбильным покрытием. В общей сложности 10 обезьянам *Сynomolgus* (5 самцов и 5 самок) вводили по одной капсуле через желудочный зонд один раз в день в течение 49 дней. Два животных (самец и самка), не получавшие лечения, были включены в исследование в качестве контрольных животных. В течение периода введения отбирали образцы крови для анализа фармакокинетики до введения дозы и через 0,5, 1,5, 3 и 5 часов после введения дозы в начале исследования и на 49-й день. Отбирали образцы крови для анализа PCSK9 и липидов на неделе -2 и -1 перед исследованием, перед введением в День 1 и затем еженедельно в течение всего исследования. Отбирали образцы для клинической химии, коагуляции и гематологии на неделе -2 и -1 перед исследованием, а также на 22 и 49 день.

**[550] Фармакодинамические результаты:** На **ФИГ. 33** показано снижение PCSK9 и ЛПНП на 22 день из запланированных 49 дней лечения. Даже в этот ранний период времени у животных наблюдалось значительное снижение PCSK-9 и ЛПНП, при этом у наиболее реагирующих животных снижение ЛПНП в плазме достигало приблизительно 60%. Уровень PCSK9 начал снижаться уже на 8-й день, а уровни PCSK9 и ЛПНП были явно снижены у большинства животных на 15-й день. На 22-й день уровень apoB-100 был значительно снижен у всех обезьян (от 25 до 45%), при этом 5/10 обезьян имели уровни ниже нижнего предела обнаружения.

**[551]** По сравнению с предыдущим экспериментом с использованием SNAC в качестве носителя для CIVI 008 (Пример 9, **ФИГ. 25А**), введение CIVI 008, содержащего 5-CNAC, вызывало более быстрое и существенное снижение уровня ЛПНП (**ФИГ. 34**), что указывает на то, что 5-CNAC был значительно более эффективным, чем SNAC, в облегчении перорального поглощения CIVI 008.

## ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

**[552]** Содержание всех цитируемых ссылок (включая ссылки на литературу, патенты, патентные заявки и веб-сайты), которые могут цитироваться в настоящей заявке, настоящим прямо включено посредством ссылки во всей своей полноте для любой цели, как и ссылки, цитируемые в ней, в версии общедоступной с 11 декабря 2020 г. Последовательности белков и нуклеиновых кислот, идентифицированные по регистрационному номеру базы данных, и другая информация, содержащаяся в записях базы данных субъекта (например, содержимое, не связанное с последовательностями, в записях базы данных, соответствующих конкретным регистрационным номерам Genbank), включены посредством ссылки и соответствуют соответствующему выпуску базы данных, общедоступному на 11 декабря 2020 г.

## ЭКВИВАЛЕНТЫ

**[553]** Хотя были проиллюстрированы и описаны различные конкретные аспекты, приведенное выше описание не является ограничивающим. Следует понимать, что могут быть сделаны различные изменения, не выходя за рамки сущности и объема изобретения(й). Специалистам в данной области техники после ознакомления с этим описанием станут очевидны многие вариации.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая антисмысловый олигомер и средство для пероральной доставки, где длина антисмыслового олигомера составляет от 16 до 22 последовательных нуклеотидов, причем последовательность антисмыслового олигомера включает непрерывную последовательность длиной 16 нуклеотидов, которая на 100% комплементарна целевой последовательности PCSK9, где антисмысловый олигомер представляет собой гэтмер, содержащий по меньшей мере одно звено LNA, и где антисмысловый олигомер нацелен на РНК, кодирующую PCSK9, и где средство для пероральной доставки ковалентно или нековалентно присоединено к антисмысловому олигомеру.
2. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что РНК представляет собой пре-мРНК, сплайс-вариант пре-мРНК, зрелую мРНК или ее аллельный вариант или мутант.
3. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что целевая последовательность PCSK9 находится в пределах экзона или интрона.
4. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что целевая последовательность PCSK9 представлена в SEQ ID NO: 31.
5. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что целевая последовательность PCSK9 содержит соединение между экзоном и интроном.
6. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что целевая последовательность PCSK9 расположена выше 5'-конца открытой рамки считывания, кодирующей PCSK9.
7. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что целевая последовательность PCSK9 находится ниже 3'-конца открытой рамки считывания, кодирующей PCSK9.
8. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что LNA представляет собой окси-LNA, тио-LNA, аминоксид-LNA, 5'-метил-LNA, ENA, сЕТ, сМОЕ или их комбинацию.

9. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что LNA представляет собой  $\alpha$ -стереоизомер в бета-D-конфигурации или альфа-L-конфигурации.
10. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что антисмысловый олигомер содержит по меньшей мере одно звено сЕТ.
11. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что антисмысловый олигомер содержит 2, 3, 4, 5, 6 или 7 звеньев LNA.
12. Фармацевтическая композиция по п. 11, отличающаяся тем, что каждое звено LNA в антисмысловом олигомере представляет собой стереоизомер в той же конфигурации.
13. Фармацевтическая композиция по п. 11, отличающаяся тем, что каждое звено LNA в антисмысловом олигомере представляет собой звено бета-D-окси LNA.
14. Фармацевтическая композиция по п. 11, отличающаяся тем, что каждое звено LNA в антисмысловом олигомере представляет собой звено альфа-L-окси-LNA.
15. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что последовательность антисмыслового олигомера включает по меньшей мере одну фосфоротриоатную, фосфородитриоатную, метилфосфонатную, фосфорамидатную или боранофосфатную межнуклеозидную связь.
16. Фармацевтическая композиция по п. 15, отличающаяся тем, что все межнуклеозидные связи являются тиофосфатными.
17. Фармацевтическая композиция по п. 15, отличающаяся тем, что одна или несколько межнуклеозидных связей содержат хиральный центр в R-конформации и/или в S-конформации.
18. Фармацевтическая композиция по п. 17, отличающаяся тем, что все хиральные центры находятся в R-конформации.

19. Фармацевтическая композиция по п. 17, отличающаяся тем, что все хиральные центры находятся в S-конформации.
20. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что антисмысловой олигомер и олигомер SEQ ID NO: 31 могут образовывать дуплекс с повышенной термостабильностью по сравнению с соответствующим дуплексом, содержащим соответствующий антисмысловой олигомер без LNA.
21. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антисмыслового олигонуклеотида и средство для пероральной доставки, отличающаяся тем, что конъюгат антисмыслового олигонуклеотида содержит:
  - (i) антисмысловой олигомер, состоящий из 16-22 последовательных нуклеотидов, при этом последовательность антисмыслового олигомера содержит непрерывную последовательность длиной 16 нуклеотидов, которая на 100% комплементарна целевой последовательности PCSK9, и где антисмысловой олигомер представляет собой гэпмер, содержащий как минимум одно звено LNA, и
  - (ii) по меньшей мере один нуклеотидный или неполинуклеотидный фрагмент, ковалентно присоединенный к указанному антисмысловому олигомеру непосредственно или через линкер, расположенный между непрерывной последовательностью олигомера и нуклеотидным или неполинуклеотидным фрагментом,

где конъюгат антисмыслового олигонуклеотида нацелен на мРНК, кодирующую PCSK9, и где средство для пероральной доставки ковалентно или нековалентно присоединено к конъюгату антисмыслового олигонуклеотида.
22. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что РНК представляет собой пре-мРНК, сплайс-вариант пре-мРНК, зрелую мРНК или ее аллельный вариант или мутант.
23. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что целевая последовательность PCSK9 находится в пределах экзона или интрона.
24. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что целевая последовательность PCSK9 представлена в SEQ ID NO: 31.

25. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что целевая последовательность PCSK9 содержит соединение между экзоном и интроном.
26. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что целевая последовательность PCSK9 находится выше 5'-конца открытой рамки считывания, кодирующей PCSK9.
27. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что целевая последовательность PCSK9 находится ниже 3'-конца открытой рамки считывания, кодирующей PCSK9.
28. Фармацевтическая композиция по пп. 21-27, отличающаяся тем, что нуклеотидный или полинуклеотидный фрагмент представляет собой фрагмент, нацеленный на печень, который присоединен к 5'-концу или к 3'-концу антисмыслового олигомера.
29. Фармацевтическая композиция по пп. 21-28, отличающаяся тем, что фрагмент, нацеленный на печень, связан с антисмысловым олигомером через линкер.
30. Фармацевтическая композиция по пп. 21-29, отличающаяся тем, что фрагмент, нацеленный на печень, содержит фрагмент конъюгата углевода, содержащий углевод, выбранный из группы, состоящей из галактозы, лактозы, N-ацетилгалактозамина (GalNAc), маннозы, маннозо-6-фосфата и их комбинации.
31. Фармацевтическая композиция по п. 30, отличающаяся тем, что углеводный конъюгат не является линейным углеводным полимером.
32. Фармацевтическая композиция по п. 30, отличающаяся тем, что углеводный конъюгат представляет собой углеводную группу, содержащую 1, 2, 3 или 4 углеводных фрагмента.
33. Фармацевтическая композиция по п. 32, отличающаяся тем, что все углеводные фрагменты идентичны.

34. Фармацевтическая композиция по п. 32, отличающаяся тем, что по меньшей мере один углеводный фрагмент отличается (не идентичен) от других углеводных фрагментов.
35. Фармацевтическая композиция по п. 32, отличающаяся тем, что фрагмент конъюгата углевода содержит по меньшей мере один фрагмент конъюгата, нацеленный на асиалогликопротеиновый рецептор.
36. Фармацевтическая композиция по п. 30, отличающаяся тем, что фрагмент конъюгата, нацеленный на асиалогликопротеиновый рецептор, содержит моновалентный, двухвалентный, трехвалентный или четырехвалентный кластер GalNAc.
37. Фармацевтическая композиция по п. 36, отличающаяся тем, что каждый GalNAc в кластере GalNAc присоединен к группе точки ветвления через спейсер.
38. Фармацевтическая композиция по п. 37, отличающаяся тем, что группа точки ветвления включает дилизин.
39. Фармацевтическая композиция по п. 37, отличающаяся тем, что спейсер содержит спейсер ПЭГ.
40. Фармацевтическая композиция по п. 30, отличающаяся тем, что линкер содержит C6 - C12 аминокильную группу или биорасщепляемый фосфат-нуклеотидный линкер, содержащий от 1 до 6 нуклеотидов.
41. Фармацевтическая композиция по п. 36, отличающаяся тем, что трехвалентный кластер GalNAc содержит Conj 1, Conj 2, Conj 1a или Conj 2a.
42. Фармацевтическая композиция по пп. 21-41, отличающаяся тем, что ненуклеотидный или неполинуклеотидный фрагмент ковалентно присоединен к антисмысловому олигомеру посредством ковалентной связи.
43. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антисмыслового олигонуклеотида SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19

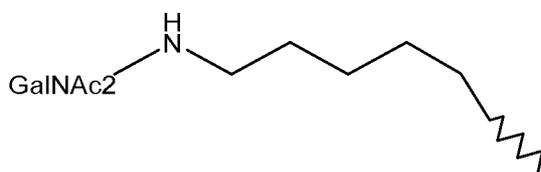


**SEQ ID 18**

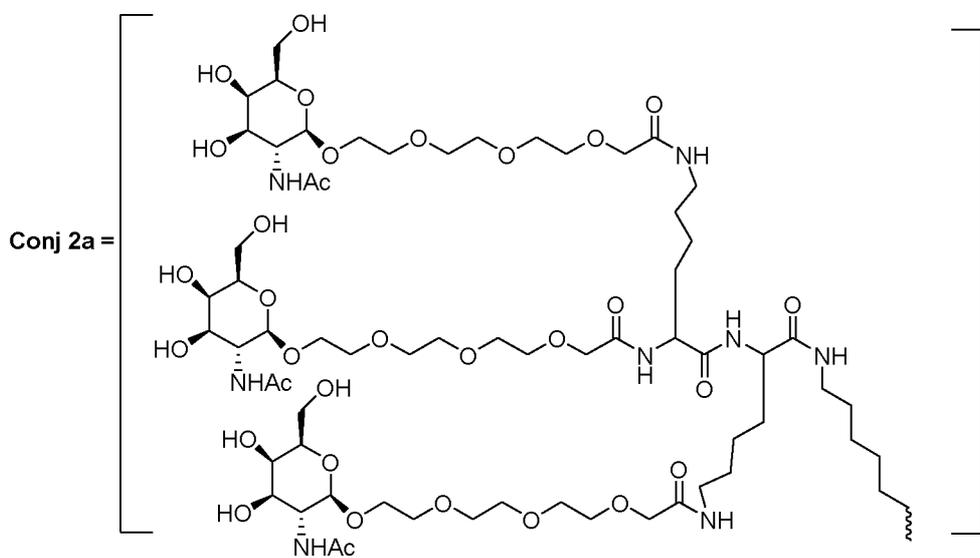


**SEQ ID 19**

и средство для пероральной доставки, где  
верхний индекс L обозначает звено бета-D-окси LNA,  
Me<sup>C</sup> обозначает звено 5-метилцитозина,  
нижний индекс s обозначает фосфотиоатную межнуклеозидную связь,  
где



представляет собой фрагмент конъюгата, нацеленный на асиалогликопротеиновый  
рецептор Conj 2a,



и где конъюгат антисмыслового олигонуклеотида нацелен на РНК, кодирующую PCSK9.

44. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-43, дополнительно содержащая по меньшей мере один фармацевтически приемлемый наполнитель или их комбинацию.
45. Фармацевтическая композиция по п. 44, отличающаяся тем, что по меньшей мере один фармацевтически приемлемый наполнитель или их комбинация выбраны из группы, состоящей из регулятора рН, консерванта, ароматизатора; агента, маскирующего вкус; ароматизатора; увлажнителя; тонизирующего средства; красителя; поверхностно-активного вещества; пластификатора; смазки; вспомогательного средства для улучшения текучести; компрессионного средства; солюбилизатора; вспомогательного вещества; разбавителя; соли фосфатного буфера; лимонной кислоты, гликоля, диспергатора, кросповидона, повидона или любой их комбинации.
46. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-43, дополнительно содержащая один или несколько терапевтических агентов, выбранных из группы, состоящей из статина, эзетимиба, смолы, связывающей желчь, никотиновой кислоты, производного фибриновой кислоты, пробукола, неомицина, декстротироксина, растительного станолевого эфира, ингибитора абсорбции холестерина, имплитапида, ингибитора переносчиков желчных кислот, регулятора печеночного СYP7a, заместительного эстрогенного терапевтического средства, противовоспалительного средства.
47. Фармацевтическая композиция по п. 46, отличающаяся тем, что статин выбран из группы, состоящей из ловастатина, церивастатина, правастатина, аторвастатина, симвастатина, розувастатина и флувастатина.
48. Способ лечения заболевания или состояния, вызванного аномальными уровнями экспрессии и/или активности PCSK9 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 1-47, где введение фармацевтической композиции

снижает уровень PCSK9 в сыворотке и/или снижает уровень холестерина ЛПНП в сыворотке у субъекта.

49. Способ по п. 48, отличающийся тем, что PCSK9 представляет собой (i) аллельный вариант PCSK9; (ii) мутант PCSK9; или (iii) сплайс-вариант PCSK9.
50. Способ по п. 49, отличающийся тем, что мутант PCSK9 представляет собой мутант PCSK9 с усилением функции.
51. Способ по п. 48, отличающийся тем, что заболевание или состояние выбирают из группы, состоящей из атеросклероза, гиперхолестеринемии, дисбаланса холестерина ЛПВП/ЛПНП, дислипидемии, заболевания коронарных артерий (CAD) и ишемической болезни сердца (CHD).
52. Способ по п. 51, отличающийся тем, что дислипидемия представляет собой наследственную гиперлипидемию (FCHL) или приобретенную гиперлипидемию.
53. Способ по п. 51, отличающийся тем, что гиперхолестеринемия представляет собой наследственную гиперхолестеринемию или резистентную к статинам гиперхолестеринемию.
54. Способ по п. 48, дополнительно включающий введение терапевтического агента, выбранного из группы, состоящей из статина, эзетимиба, смолы, связывающей желчь, никотиновой кислоты, производного фибриновой кислоты, пробукола, неомицина, декстротироксина, растительного станолювого эфира, ингибитора абсорбции холестерина, имплитапида, ингибитора переносчиков желчных кислот, регулятора печеночного CYP7a, заместительного эстрогенного терапевтического средства, противовоспалительного средства.
55. Способ по п. 54, отличающийся тем, что статин выбран из группы, состоящей из ловастатина, церивастатина, правастатина, аторвастатина, симвастатина, розувастатина и флувастатина.
56. Способ по п. 55, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию вводят перорально.

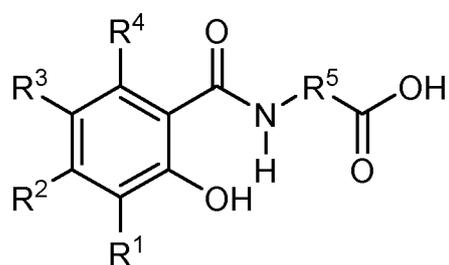
57. Способ по п. 48, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию вводят в виде однократной дозы.
58. Способ по п. 48, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию вводят в виде нескольких доз.
59. Способ лечения расстройства, выбранного из группы, состоящей из атеросклероза, гиперлипидемии, гиперхолестеринемии, дисбаланса холестерина ЛПВП/ЛПНП, заболевания коронарных артерий (CAD) и ишемической болезни сердца (CHD) у субъекта, нуждающегося в этом, отличающийся тем, что способ включает введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 1-47.
60. Способ снижения уровня экспрессии и/или активности PCSK9 в клетке *in vitro*, включающий введение в клетку эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 1-47.
61. Способ снижения уровней экспрессии и/или активности PCSK9 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 1-47.
62. Способ снижения уровня холестерина у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 1-47.
63. Способ получения фармацевтической композиции, включающий смешивание (i) антисмыслового олигомера длиной от 16 до 22 последовательных нуклеотидов, где последовательность антисмыслового олигомера включает непрерывную последовательность длиной 16 нуклеотидов, которая на 100% комплементарна последовательности SEQ. ID NO: 31, где антисмысловый олигомер представляет собой гэпмер, содержащий по меньшей мере одно звено LNA, и где антисмысловый олигомер нацелен на РНК, кодирующую PCSK9; и (ii) средства для пероральной доставки.
64. Способ получения фармацевтической композиции, включающий смешивание

(i) конъюгата, содержащего (а) антисмысловой олигомер, состоящий из 16-22 последовательных нуклеотидов, где последовательность антисмыслового олигомера содержит непрерывную последовательность длиной 16 нуклеотидов, которая на 100% комплементарна последовательности SEQ ID NO: 31, и где антисмысловой олигомер представляет собой гэтмер, содержащий по меньшей мере одно звено LNA, и (б) по меньшей мере один ненуклеотидный или неполинуклеотидный фрагмент, ковалентно присоединенный к указанному антисмысловому олигомеру непосредственно или через линкер, расположенный между непрерывной последовательностью олигомера и не-нуклеотидный или неполинуклеотидный фрагмент, где конъюгат антисмыслового олигонуклеотида нацелен на РНК, кодирующую PCSK9; и,

(ii) средства для пероральной доставки.

65. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-47 или способ по любому из пп. 48-64, отличающиеся тем, что последовательность антисмыслового олигомера содержит или состоит из SEQ ID NO: 26.
66. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-47 или способ по любому из пп. 48-64, отличающиеся тем, что последовательность антисмыслового олигомера содержит или состоит из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.
67. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 21-47 или способ по любому из пп. 48-64, отличающиеся тем, что последовательность конъюгата антисмыслового олигомера содержит или состоит из SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19.
68. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-47 или 65-67 или способ по любому из пп. 48-67, отличающиеся тем, что средство для пероральной доставки содержит каприловую кислоту (C8), каприновую кислоту (C10), его производное, его фармацевтически приемлемую соль или любую их комбинацию.
69. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-47 или 65-68 или способ по любому из пп. 48-68, отличающиеся тем, что фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.

70. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-47 или 65-69 или способ по любому из пп. 48-69, отличающиеся тем, что фармацевтическая композиция является твердой.
71. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-47 или 65-70 или способ по любому из пп. 48-70, отличающиеся тем, что фармацевтическая композиция находится в форме таблетки или капсулы.
72. Фармацевтическая композиция или способ по п. 71, отличающаяся тем, что капсула представляет собой жидкую капсулу.
73. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-47 или 65-72 или способ по любому из пп. 48-72, отличающиеся тем, что фармацевтическая композиция имеет энтеросолюбильное покрытие.
74. Фармацевтическая композиция или способ по п. 71, отличающиеся тем, что таблетка или капсула покрыты энтеросолюбильным покрытием.
75. Фармацевтическая композиция или способ по пп. 71-74, отличающаяся тем, что таблетка или капсула имеют массу от 5 мг до 1000 мг, от 10 мг до 500 мг, от 10 мг до 250 мг, от 100 мг до 200 мг или от 250 мг до 500 мг.
76. Фармацевтическая композиция или способ по пп. 71-75, отличающиеся тем, что количество антисмыслового олигомера или конъюгата антисмыслового олигонуклеотида в таблетке или капсуле находится в диапазоне от 1 мг до 100 мг, от 5 мг до 100 мг, от 10 мг до 100 мг, от 20 мг до 100 мг, 20 мг и 50 мг.
77. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-47 или 65-76 или способ по любому из пп. 48-76, отличающиеся тем, что средство для пероральной доставки представляет собой



где

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  и  $R^4$  представляет собой независимо водород, —ОН, —NR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>, галоген, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкокси;

$R^5$  представляет собой замещенный или незамещенный C<sub>2</sub>-C<sub>16</sub> алкилен, замещенный или незамещенный C<sub>2</sub>-C<sub>16</sub> алкенилен, замещенный или незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкил(арилен) или замещенный или незамещенный арил(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкилен); и

$R^6$  и  $R^7$  представляет собой независимо водород, кислород или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил.

78. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-47 или 65-77 или способ по любому из пп. 48-77, отличающиеся тем, что средство доставки выбрано из группы, состоящей из N-(8-[2-гидроксибензоил]амино)каприловой кислоты (SNAC), N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты (5-CNAC), N-(10-[2-гидроксибензоил]амино)декановой кислоты (SNAD), 4-[(4-хлор-2-гидроксибензоил)амино]бутановой кислоты (4-CNAB), N-(8-[4-метокси-хлор-2-гидроксибензоил]амино)октановой кислоты (4-MOAC), 8-(4-гидроксифенокси)октановой кислоты (4-HPO), 4-м-толилоксимасляной кислоты (3-TBA), 4-(3-гидроксифенилсульфанил)масляной кислоты (3-HPSB), 5-фенилпентановой кислоты (5-PPA), 8-(2-гидроксифенокси)октилдиэтанолamina (2-HPOD), (4-изопропилбензилокси)уксусной кислоты (4-IBOA), 2-(5-пентановая кислота)-5-(2-гидроксифенил)-1,3,4-оксадиазола (2-PHOD), 7-оксо-7-фенилгептановой кислоты (7-OPHA), 4-(3-фторфенилсульфанил)масляной кислоты (3-FPSB) или любой их комбинации.
79. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-47 или 65-78 или способ по любому из пп. 48-78, отличающиеся тем, что средство для пероральной доставки представляет собой соль, гидрат или сольват N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты или их комбинацию.
80. Фармацевтическая композиция или способ по п. 79, отличающаяся тем, что соль N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты выбрана из группы, состоящей из натриевой соли, калиевой соли, кальциевой соли N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты и любой их комбинации.

81. Фармацевтическая композиция или способ по п. 80, отличающиеся тем, что солью N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты является натриевая соль.
82. Фармацевтическая композиция или способ по п. 80, отличающиеся тем, что соль N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты представляет собой моонатриевую соль (Салькапрозат натрия 203787-91-1, SNAC, натрий 8-(2-гидроксибензамидо)октаноат).
83. Фармацевтическая композиция или способ по п. 80, отличающиеся тем, что соль N-(8-(2-гидроксибензоил)амино)каприловой кислоты представляет собой динатриевую соль.
84. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-47 или 65-78 или способ по любому из пп. 48-78, отличающиеся тем, что средство для пероральной доставки представляет собой соль, гидрат или сольват N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты или их комбинацию.
85. Фармацевтическая композиция или способ по п. 84, отличающиеся тем, что соль N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты выбрана из группы, состоящей из натриевой соли, калиевой соли, кальциевой соли N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты и любой их комбинации.
86. Фармацевтическая композиция или способ по п. 85, отличающиеся тем, что солью N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты является натриевая соль.
87. Фармацевтическая композиция или способ по п. 85, отличающиеся тем, что соль N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты представляет собой моонатриевую соль.
88. Фармацевтическая композиция или способ по п. 85, отличающиеся тем, что соль N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты представляет собой динатриевую соль.
89. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-47 или 65-88, или способ по любому из пп. 48-88, отличающиеся тем, что средство для пероральной доставки

представляет собой соль, гидрат или сольват каприновой кислоты (C10) или комбинацию.

90. Фармацевтическая композиция или способ по п. 89, отличающиеся тем, что соль каприновой кислоты (C10) выбрана из группы, состоящей из натриевой соли, калиевой соли и кальциевой соли каприновой кислоты (C10) и любой их комбинации.
91. Фармацевтическая композиция или способ по п. 90, отличающиеся тем, что солью каприновой кислоты (C10) является каприлат натрия.
92. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-47 или 65-91 или способ по любому из пп. 48-91, отличающиеся тем, что фармацевтическую композицию вводят за 5-60 минут до еды.
93. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-47 или 65-92 или способ по любому из пп. 48-91, отличающиеся тем, что фармацевтическую композицию вводят по меньшей мере за 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 минут до еды.
94. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-47 или 65-93 или способ по любому из пп. 48-93, отличающиеся тем, что фармацевтическая композиция дополнительно содержит рН-чувствительное покрытие.
95. Фармацевтическая композиция или способ по п. 94, отличающиеся тем, что рН-чувствительное покрытие представляет собой рН-чувствительный полимер.
96. Фармацевтическая композиция или способ по п. 94, отличающиеся тем, что рН-чувствительный полимер содержит целлюлозу, акриловую кислоту или их производное.
97. Фармацевтическая композиция или способ по пп. 94-96, отличающиеся тем, что рН-чувствительное покрытие содержит рН-чувствительный гидрогель, рН-активируемую систему доставки лекарственного средства, рН-чувствительные

липосомы, мицеллы или липидные наночастицы, рН-чувствительные микросферы, рН-чувствительные наночастица или любую их комбинацию.

98. Таблетка или капсула, содержащая

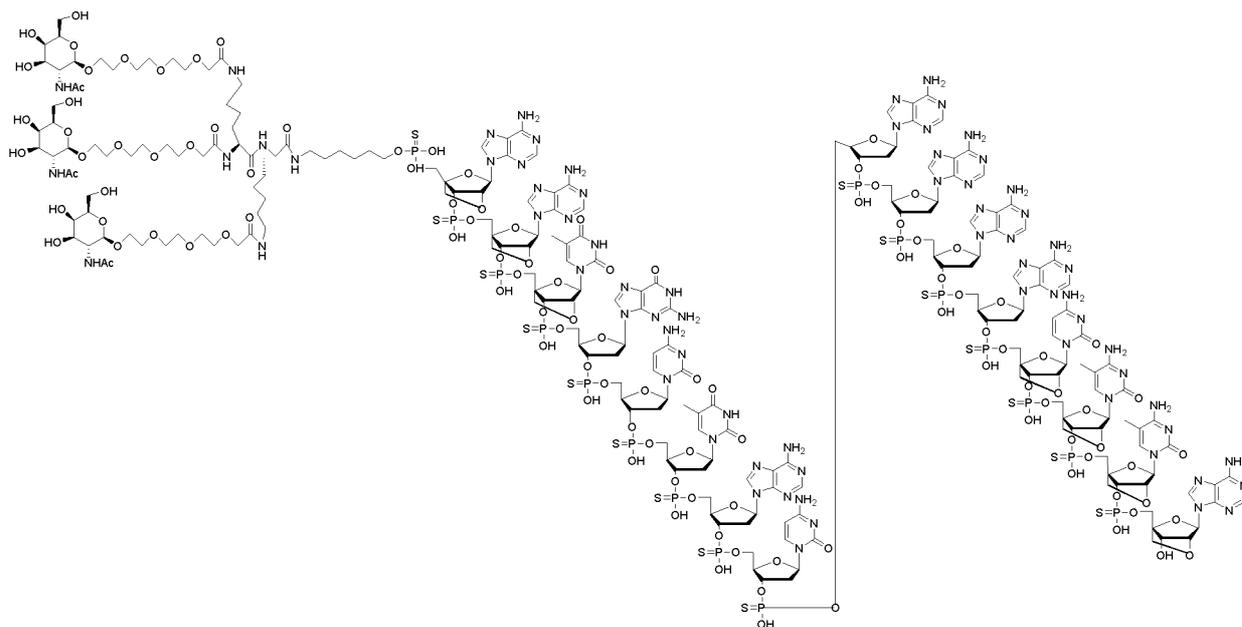
(i) (GalNAc)<sub>3</sub>-аминогексаметилен-5' фосфоротиоил)-2'-О,4'-С-метилен-Аденосил-ил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)- 2'- О,4'-С-метилен Аденосил-ил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)-2'- О,4'-С-метилен Тимидил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)- 2'- дезоксиГуаносил-ил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)- 2'-дезоксиЦитидинил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)-2'-дезоксиТимидил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)- 2'-дезоксиАденосил-ил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)- 2'-дезоксиЦитидинил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)-2'-дезоксиАденосил-ил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)-2'-дезоксиАденозил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)- 2'-дезоксиАденозил- (3'>5' О,О-фосфоротиоил)-2'-дезоксиЦитидинил-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)- 2'-О,4'-С-метилен (5-метил-Цитидинил)-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)- 2' -О,4'-С-метилен (5-метил-Цитидинил)-(3'>5' О,О-фосфоротиоил)- 2'-О,4'-С-метилен-Аденосил-ил гексадеканатриевая соль,

(ii) средство для пероральной доставки, выбранное из группы, состоящей из SNAC, 5-CNAC, C10, их гидратов, сольватов или солей и их комбинаций; и

(iii) необязательно, статин.

99. Таблетка или капсула, содержащая

(i) CIVI 008



- (ii) средство для пероральной доставки, выбранное из группы, состоящей из SNAC, 5-CNAC, C10, их гидратов, сольватов или солей и их комбинаций; и
- (iii) необязательно, статин.

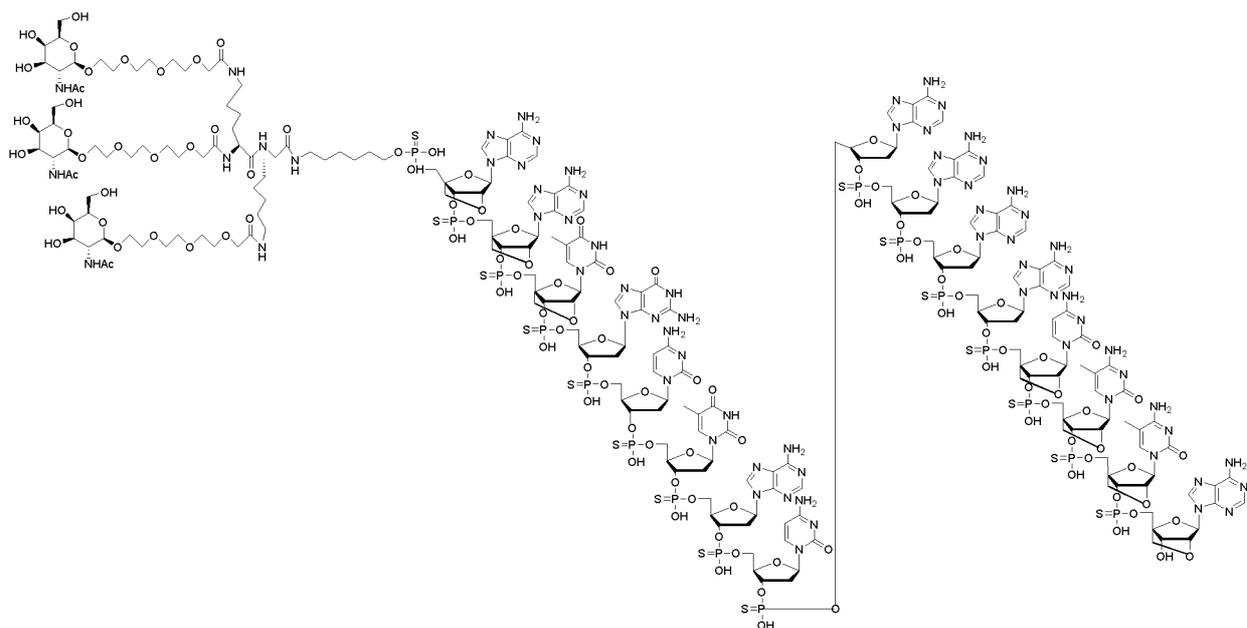
100. Таблетка или капсула по п. 98 или 99, отличающаяся тем, что средство для пероральной доставки представляет собой SNAC.
101. Таблетка или капсула по п. 100, отличающаяся тем, что SNAC представляет собой моносодиевую соль.
102. Таблетка или капсула по п. 100, отличающаяся тем, что SNAC представляет собой динатриевую соль.
103. Таблетка или капсула по п. 98 или 99, отличающаяся тем, что средство для пероральной доставки представляет собой 5-CNAC.
104. Таблетка или капсула по п. 103, отличающаяся тем, что 5-CNAC представляет собой моносодиевую соль.
105. Таблетка или капсула по п. 103, отличающаяся тем, что 5-CNAC представляет собой динатриевую соль.

106. Таблетка или капсула по п. 98 или 99, отличающаяся тем, что средство для пероральной доставки представляет собой С10.

107. Таблетка или капсула по п. 98 или 99, отличающаяся тем, что средство для пероральной доставки представляет собой С8 или С12.

108. Капсула, содержащая

(i) CIVI 008



(ii) 5-CNAC.

109. Капсула по п. 108, отличающаяся тем, что CIVI 008 и 5-CNAC находятся в форме сухой смеси.

110. Капсула по п. 108 или 109, отличающаяся тем, что капсула представляет собой желатиновую капсулу.

111. Капсула по п. 110, отличающаяся тем, что гелевая капсула представляет собой желатиновую капсулу с твердой оболочкой.

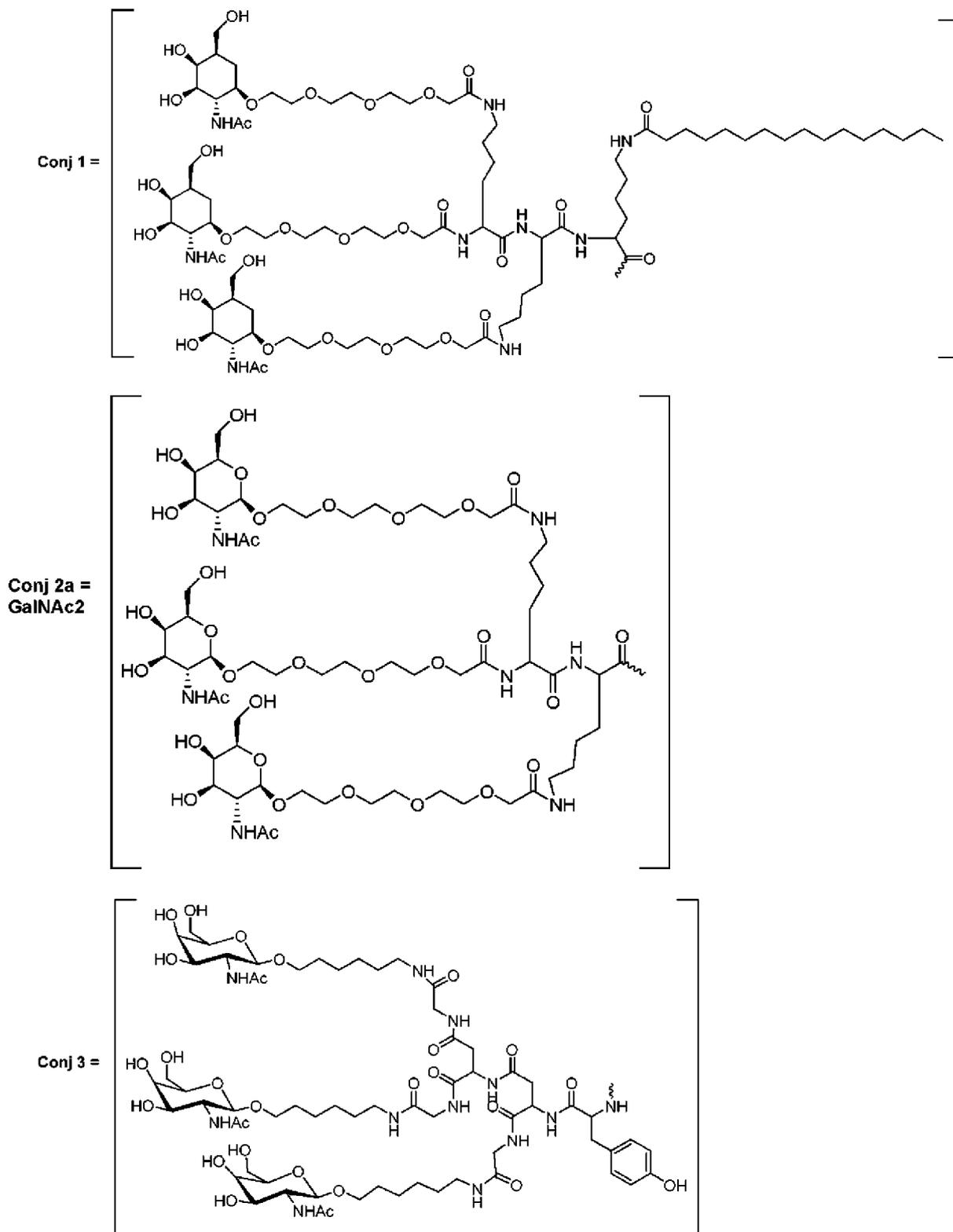
112. Капсула по любому из пп. 108-111, отличающаяся тем, что капсула покрыта энтеросолюбильным покрытием.

113. Капсула по любому из пп. 108-112, отличающаяся тем, что капсула содержит от 5 до 30 мг CIVI 008 и от 100 до 200 мг 5-CNAC.
114. Капсула по п. 113, отличающаяся тем, что капсула содержит около 5 мг, около 10 мг, около 20 мг, около 25 мг или около 30 мг CIVI 008.
115. Капсула по любому из пп. 108-114, отличающаяся тем, что капсула содержит:
- 10 мг CIVI 008 и 100 мг 5-CNAC;
  - 20 мг CIVI 008 и 200 мг 5-CNAC;
  - 5 мг CIVI 008 и 200 мг 5-CNAC;
  - 10 мг CIVI 008 и 200 мг 5-CNAC;
  - 25 мг CIVI 008 и 200 мг 5-CNAC; или,
  - 30 мг CIVI 008 и 200 мг 5-CNAC.
116. Капсула по любому из пп. 108-115, дополнительно содержит статин.
117. Способ лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из атеросклероза, гиперлипидемии, гиперхолестеринемии, дисбаланса холестерина ЛПВП/ЛПНП, заболевания коронарных артерий (CAD) и ишемической болезни сердца (CHD) у субъекта, нуждающегося в этом, отличающийся тем, что способ включает введение субъекту капсулы по любому из пп. 108-116.
118. Способ снижения уровней экспрессии и/или активности PCSK9 у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту капсулы по любому из пп. 108-116.
119. Способ снижения уровня холестерина у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту капсулы по любому из пп. 108-116.
120. Капсула по любому из пп. 108-116 для применения при лечении расстройства, выбранного из группы, состоящей из атеросклероза, гиперлипидемии, гиперхолестеринемии, дисбаланса холестерина ЛПВП/ЛПНП, заболевания коронарных артерий (CAD) и ишемической болезни сердца (CHD).
121. Капсула по любому из пп. 108-116 для применения в качестве лекарственного средства для снижения уровня экспрессии и/или активности PCSK9 у субъекта.

122. Капсула по любому из пп. 108-116 для применения в качестве лекарственного средства для снижения уровня холестерина у субъекта.
123. Способ получения капсулы по любому из пп. 108-116, включающий:
- (i) сухое смешивание первой композиции, содержащей CIVI 008, и второй композиции, содержащей 5-CNAC; и,
  - (ii) инкапсулирование полученной сухой смеси со стадии (i) в капсулу.

ПЕРОРАЛЬНАЯ ДОСТАВКА АНТИСМЫСЛОВЫХ КОНЬЮГАТОВ,  
НАЦЕЛЕННЫХ НА PCSK9

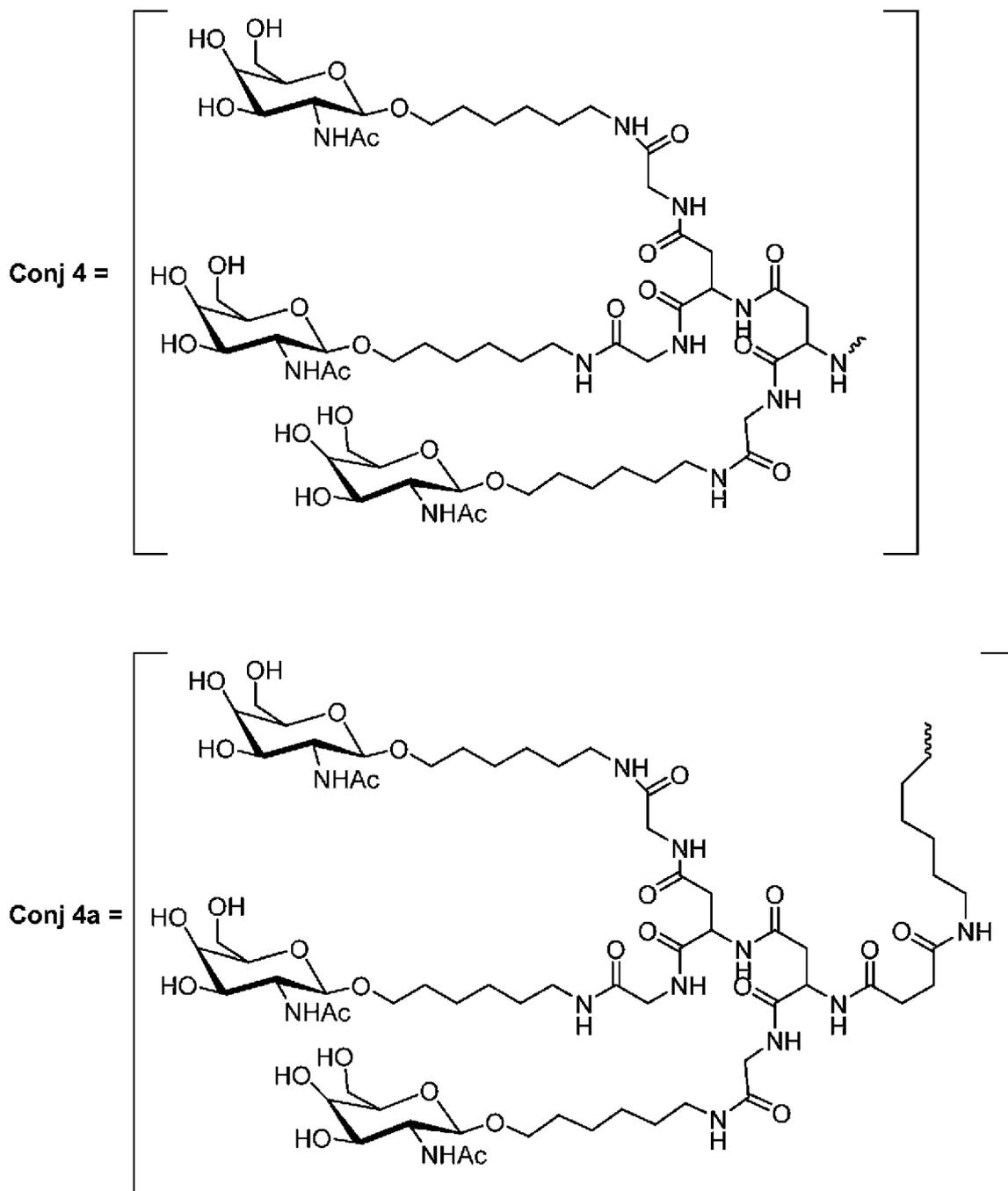
1/41



Фиг. 1А

ПЕРОРАЛЬНАЯ ДОСТАВКА АНТИСМЫСЛОВЫХ КОНЬЮГАТОВ,  
НАЦЕЛЕННЫХ НА PCSK9

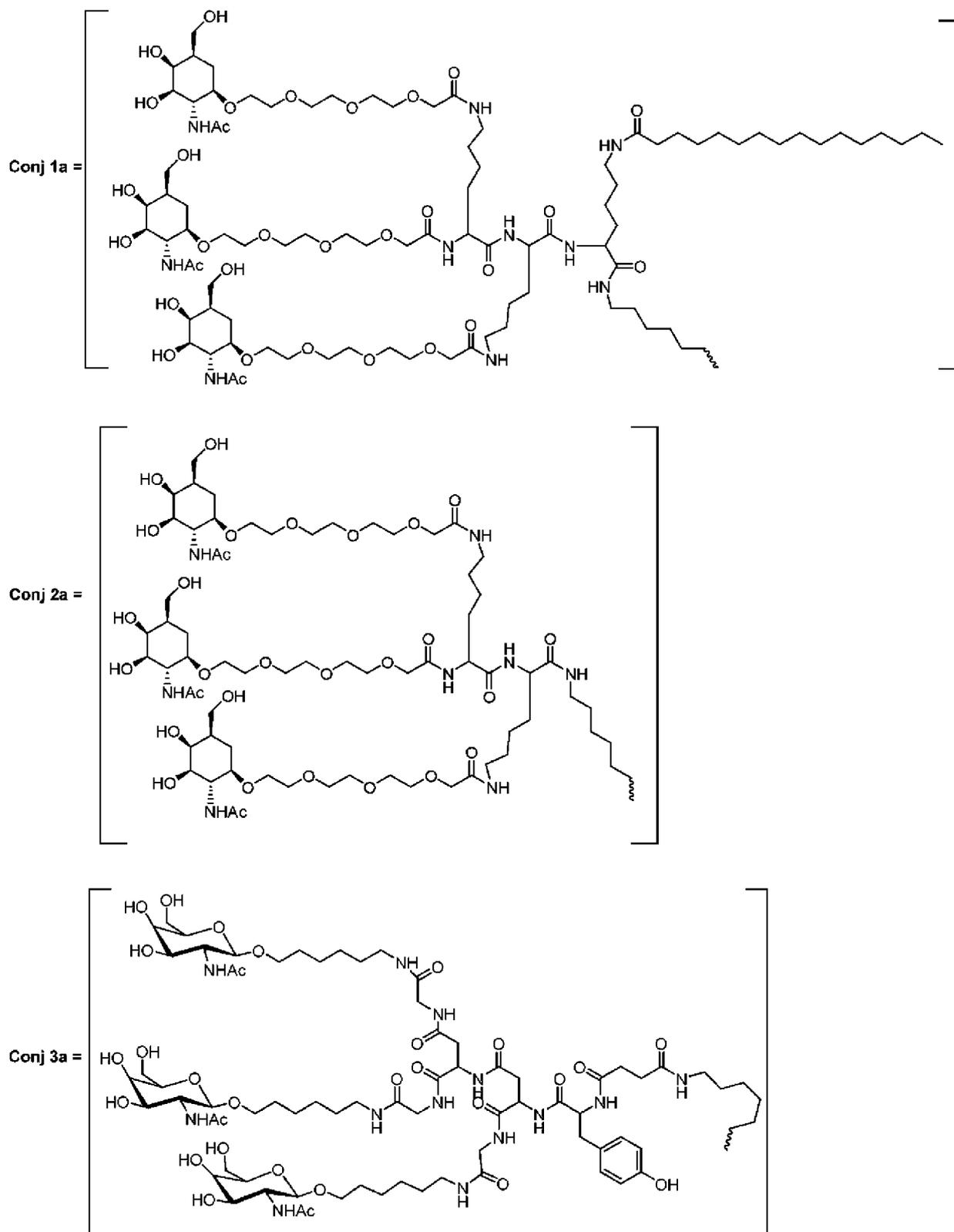
2/41



Фиг. 1В

ПЕРОРАЛЬНАЯ ДОСТАВКА АНТИСМЫСЛОВЫХ КОНЬЮГАТОВ,  
НАЦЕЛЕННЫХ НА PCSK9

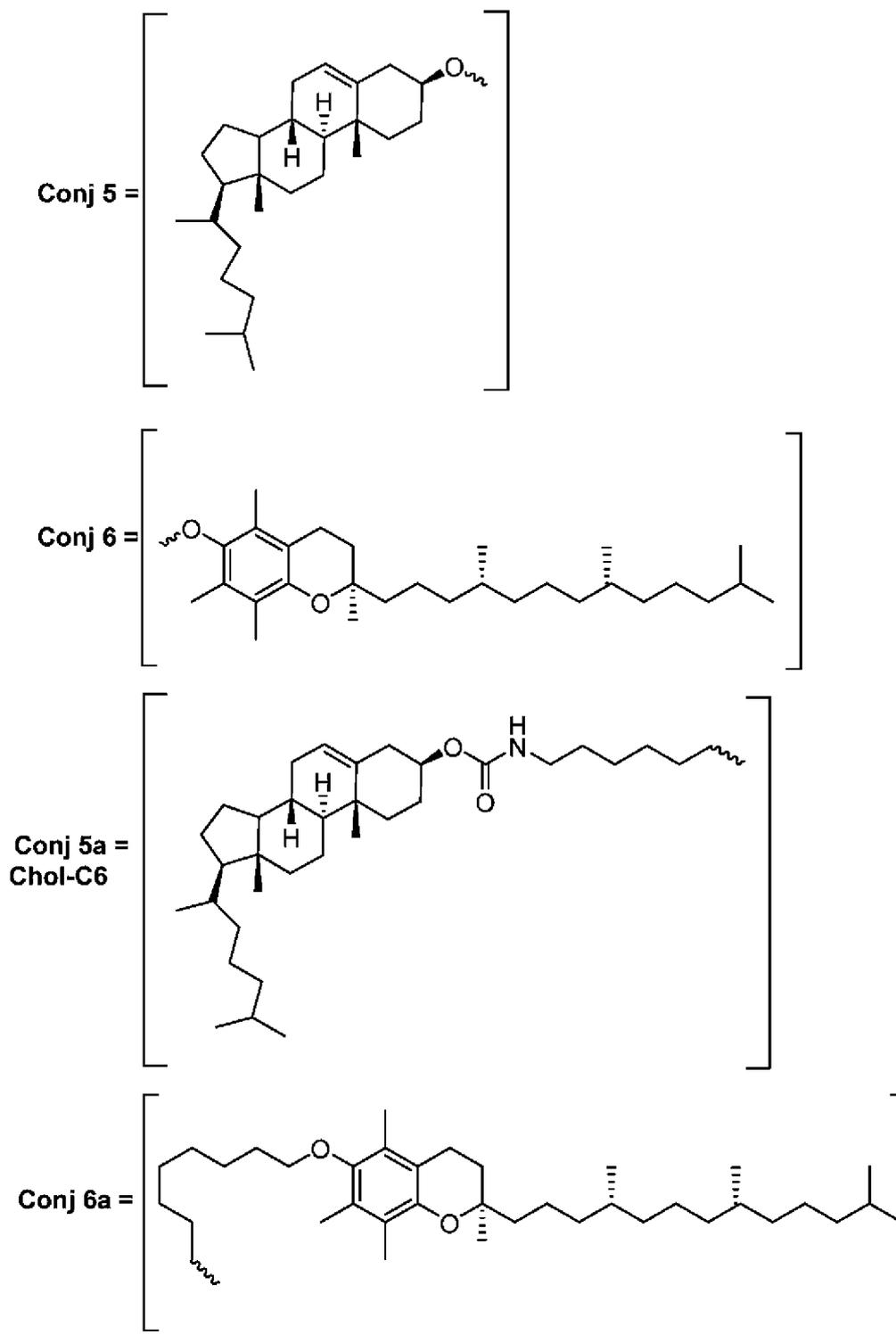
3/41



Фиг. 1С

ПЕРОРАЛЬНАЯ ДОСТАВКА АНТИСМЫСЛОВЫХ КОНЬЮГАТОВ,  
НАЦЕЛЕННЫХ НА PCSK9

4/41



ФИГ. 2

5'-T<sub>S</sub><sup>L</sup>G<sub>S</sub><sup>L</sup>MeC<sub>S</sub><sup>L</sup>T<sub>S</sub>A<sub>S</sub>C<sub>S</sub>A<sub>S</sub>A<sub>S</sub>A<sub>S</sub>A<sub>S</sub>C<sub>S</sub><sup>MeC<sub>S</sub><sup>L</sup>MeC<sub>S</sub><sup>L</sup>A<sub>S</sub><sup>L</sup>-3'</sup>  
SEQ ID 1

5'-A<sub>S</sub><sup>L</sup>A<sub>S</sub><sup>L</sup>T<sub>S</sub><sup>L</sup>G<sub>S</sub>C<sub>S</sub>T<sub>S</sub>A<sub>S</sub>C<sub>S</sub>A<sub>S</sub>A<sub>S</sub>A<sub>S</sub>A<sub>S</sub>C<sub>S</sub><sup>MeC<sub>S</sub><sup>L</sup>MeC<sub>S</sub><sup>L</sup>MeC<sub>S</sub><sup>L</sup>A<sub>S</sub><sup>L</sup>-3'</sup>  
SEQ ID 2

5'-A<sub>S</sub><sup>L</sup>A<sub>S</sub><sup>L</sup>T<sub>S</sub><sup>L</sup>G<sub>S</sub>C<sub>S</sub>T<sub>S</sub>A<sub>S</sub>C<sub>S</sub>A<sub>S</sub>A<sub>S</sub>A<sub>S</sub>A<sub>S</sub>C<sub>S</sub><sup>MeC<sub>S</sub><sup>L</sup>MeC<sub>S</sub><sup>L</sup>A<sub>S</sub><sup>L</sup>-3'</sup>  
SEQ ID 3

5'-G<sub>S</sub><sup>L</sup>MeC<sub>S</sub><sup>L</sup>T<sub>S</sub>G<sub>S</sub>T<sub>S</sub>G<sub>S</sub>T<sub>S</sub>G<sub>S</sub>A<sub>S</sub>G<sub>S</sub>C<sub>S</sub>T<sub>S</sub>T<sub>S</sub>G<sub>S</sub><sup>L</sup>G<sub>S</sub><sup>L</sup>-3'  
SEQ ID 4

5'-T<sub>S</sub><sup>L</sup>G<sub>S</sub><sup>L</sup>C<sub>S</sub>T<sub>S</sub>G<sub>S</sub>T<sub>S</sub>G<sub>S</sub>T<sub>S</sub>G<sub>S</sub>A<sub>S</sub>G<sub>S</sub>C<sub>S</sub>T<sub>S</sub>T<sub>S</sub><sup>L</sup>G<sub>S</sub><sup>L</sup>G<sub>S</sub><sup>L</sup>-3'  
SEQ ID 5

5'-T<sub>S</sub><sup>L</sup>G<sub>S</sub><sup>L</sup>MeC<sub>S</sub><sup>L</sup>T<sub>S</sub>G<sub>S</sub>T<sub>S</sub>G<sub>S</sub>T<sub>S</sub>G<sub>S</sub>A<sub>S</sub>G<sub>S</sub>C<sub>S</sub>T<sub>S</sub>T<sub>S</sub><sup>L</sup>G<sub>S</sub><sup>L</sup>G<sub>S</sub><sup>L</sup>-3'  
SEQ ID 6

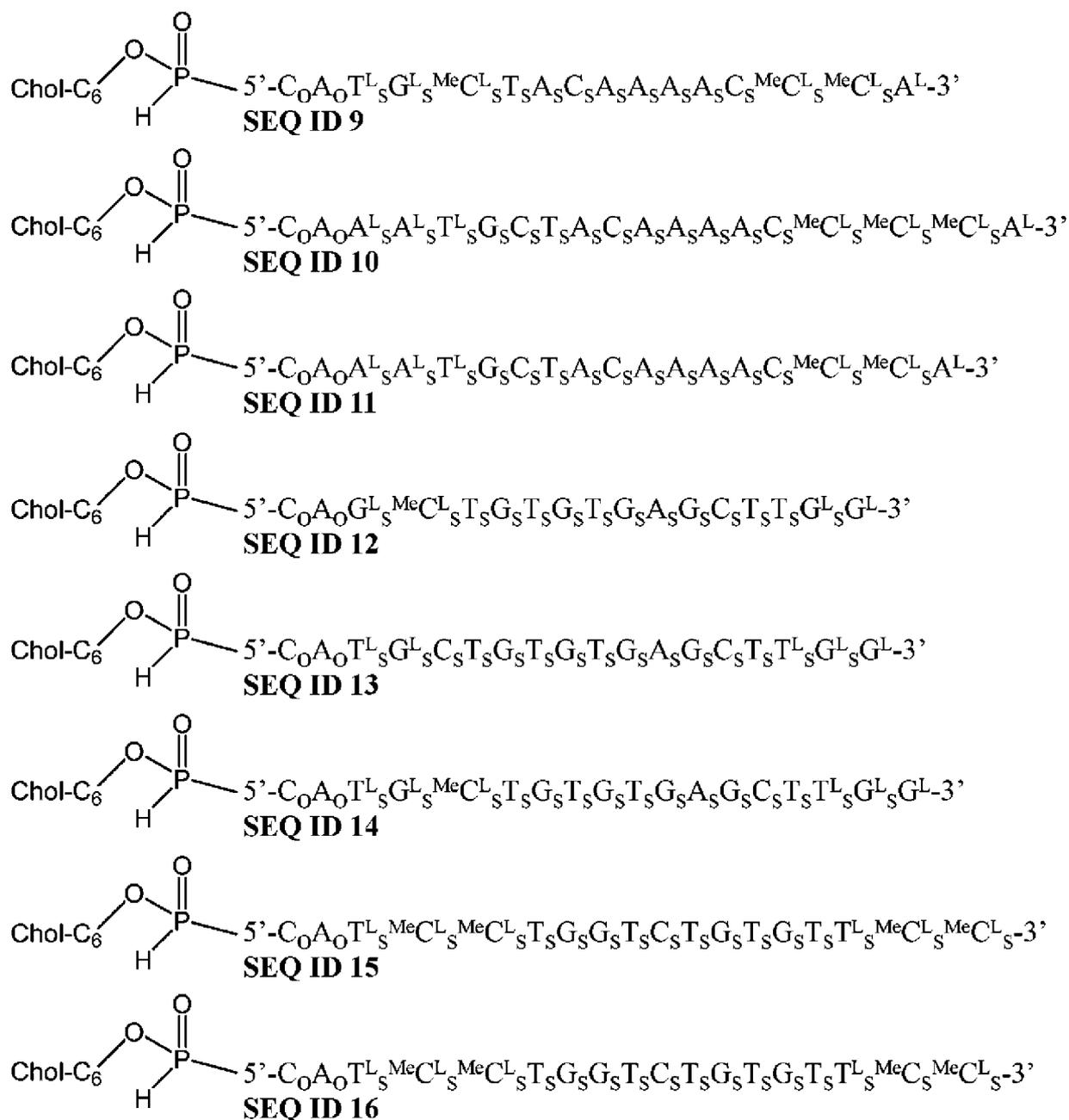
5'-T<sub>S</sub><sup>L</sup>MeC<sub>S</sub><sup>L</sup>MeC<sub>S</sub><sup>L</sup>T<sub>S</sub>G<sub>S</sub>G<sub>S</sub>T<sub>S</sub>C<sub>S</sub>T<sub>S</sub>G<sub>S</sub>T<sub>S</sub>G<sub>S</sub>T<sub>S</sub>T<sub>S</sub><sup>L</sup>MeC<sub>S</sub><sup>L</sup>MeC<sub>S</sub><sup>L</sup>-3'  
SEQ ID 7

5'-T<sub>S</sub><sup>L</sup>MeC<sub>S</sub><sup>L</sup>MeC<sub>S</sub><sup>L</sup>T<sub>S</sub>G<sub>S</sub>G<sub>S</sub>T<sub>S</sub>C<sub>S</sub>T<sub>S</sub>G<sub>S</sub>T<sub>S</sub>G<sub>S</sub>T<sub>S</sub>T<sub>S</sub><sup>L</sup>MeC<sub>S</sub><sup>L</sup>MeC<sub>S</sub><sup>L</sup>-3'  
SEQ ID 8

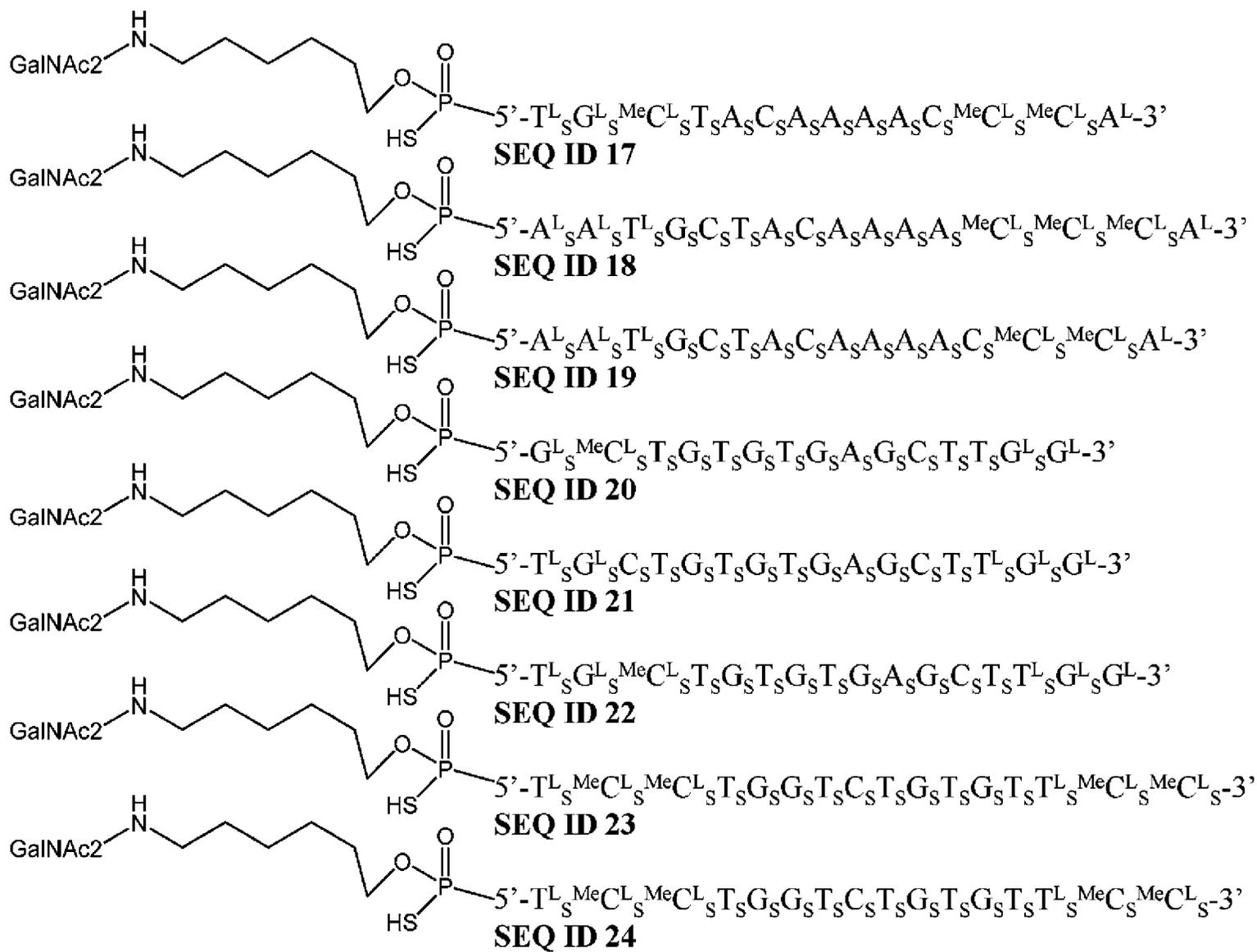
Фиг. 3

ПЕРОРАЛЬНАЯ ДОСТАВКА АНТИСМЫСЛОВЫХ КОНЬЮГАТОВ,  
НАЦЕЛЕННЫХ НА PCSK9

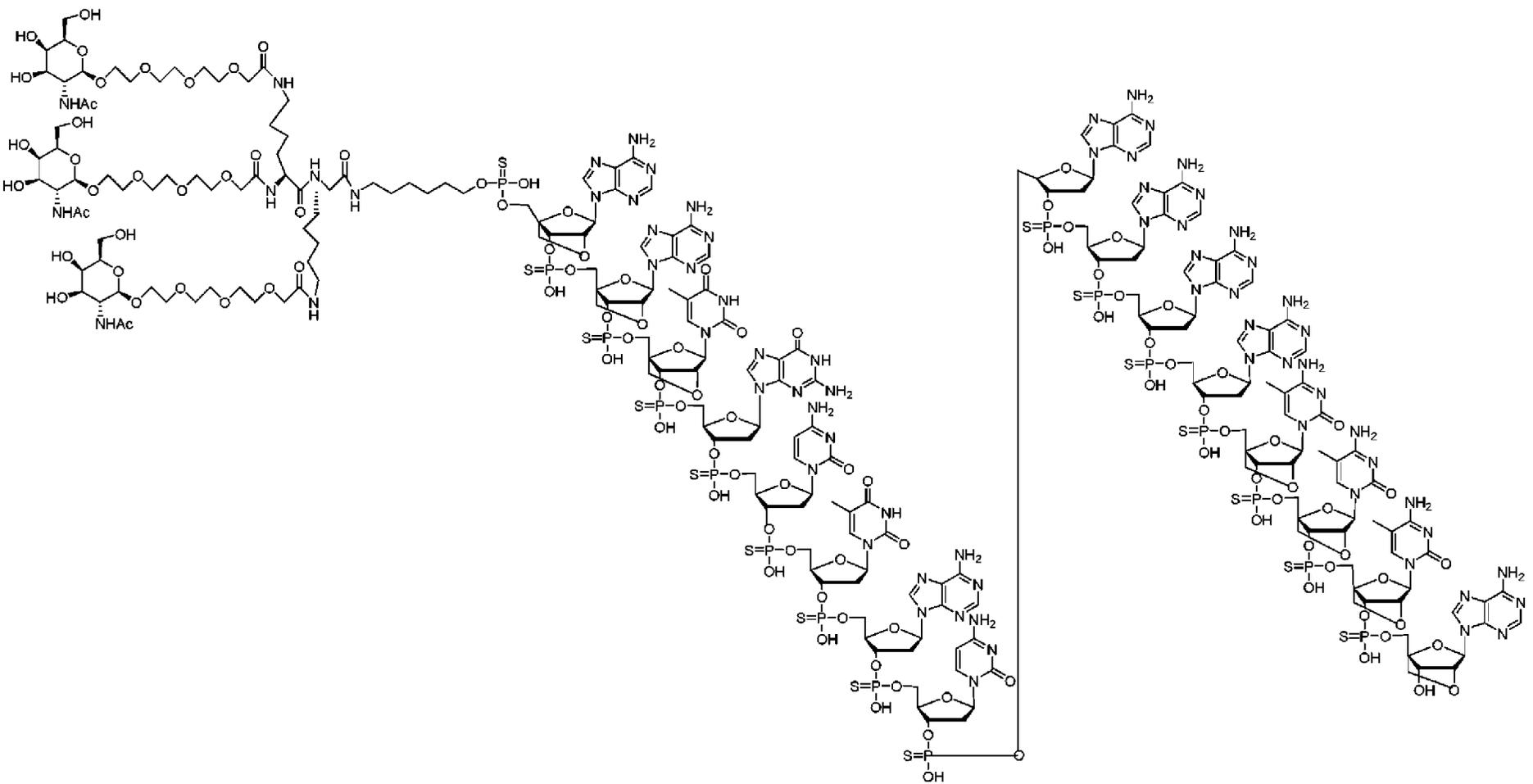
6/41



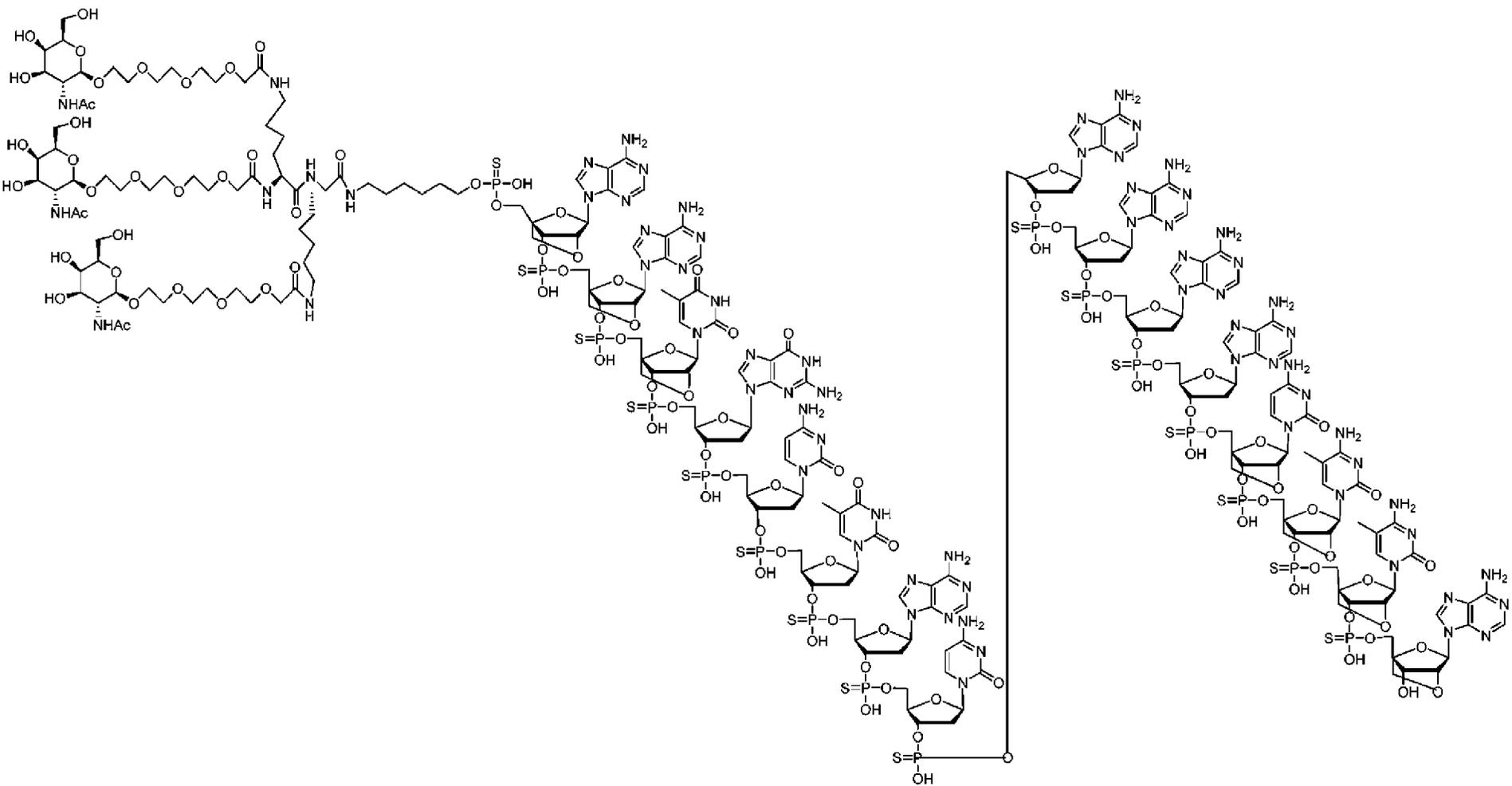
Фиг. 4



Фиг. 5А

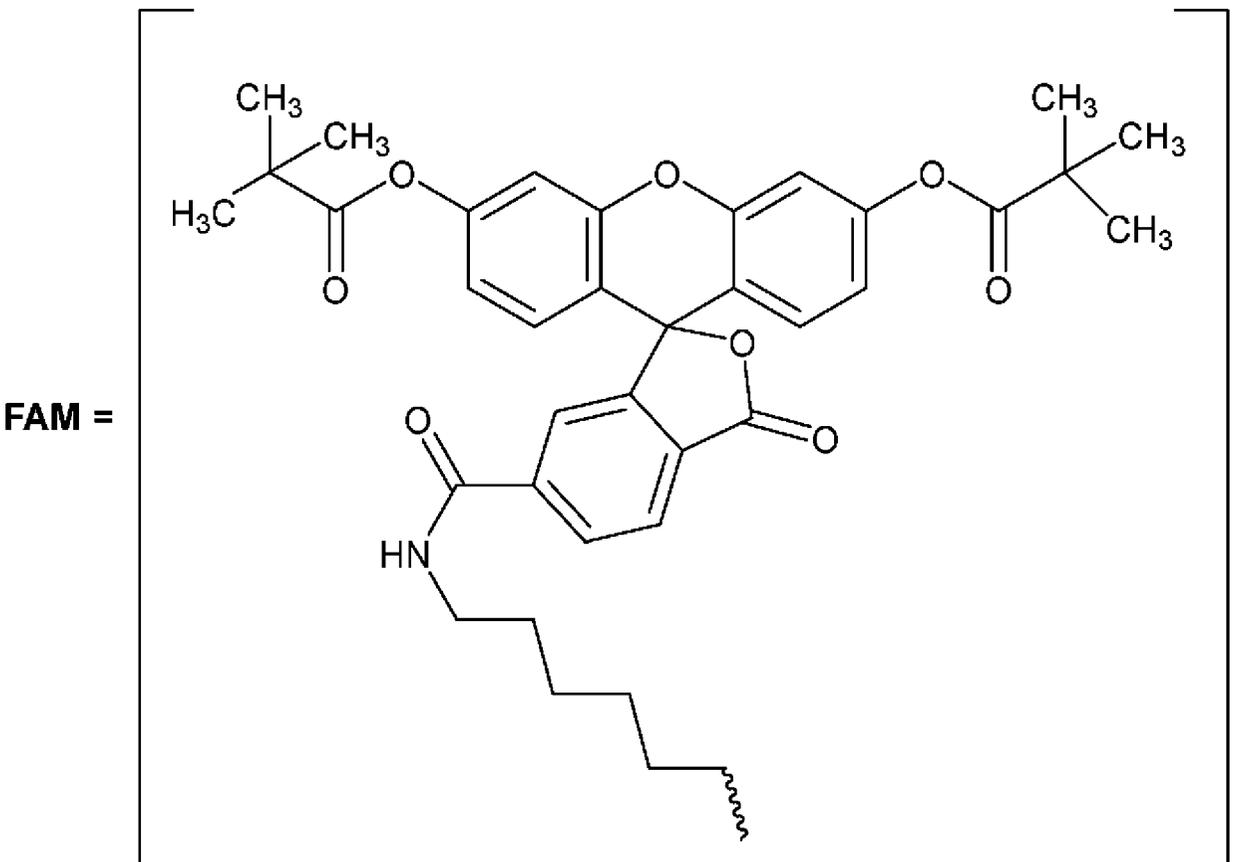


Фиг. 5В

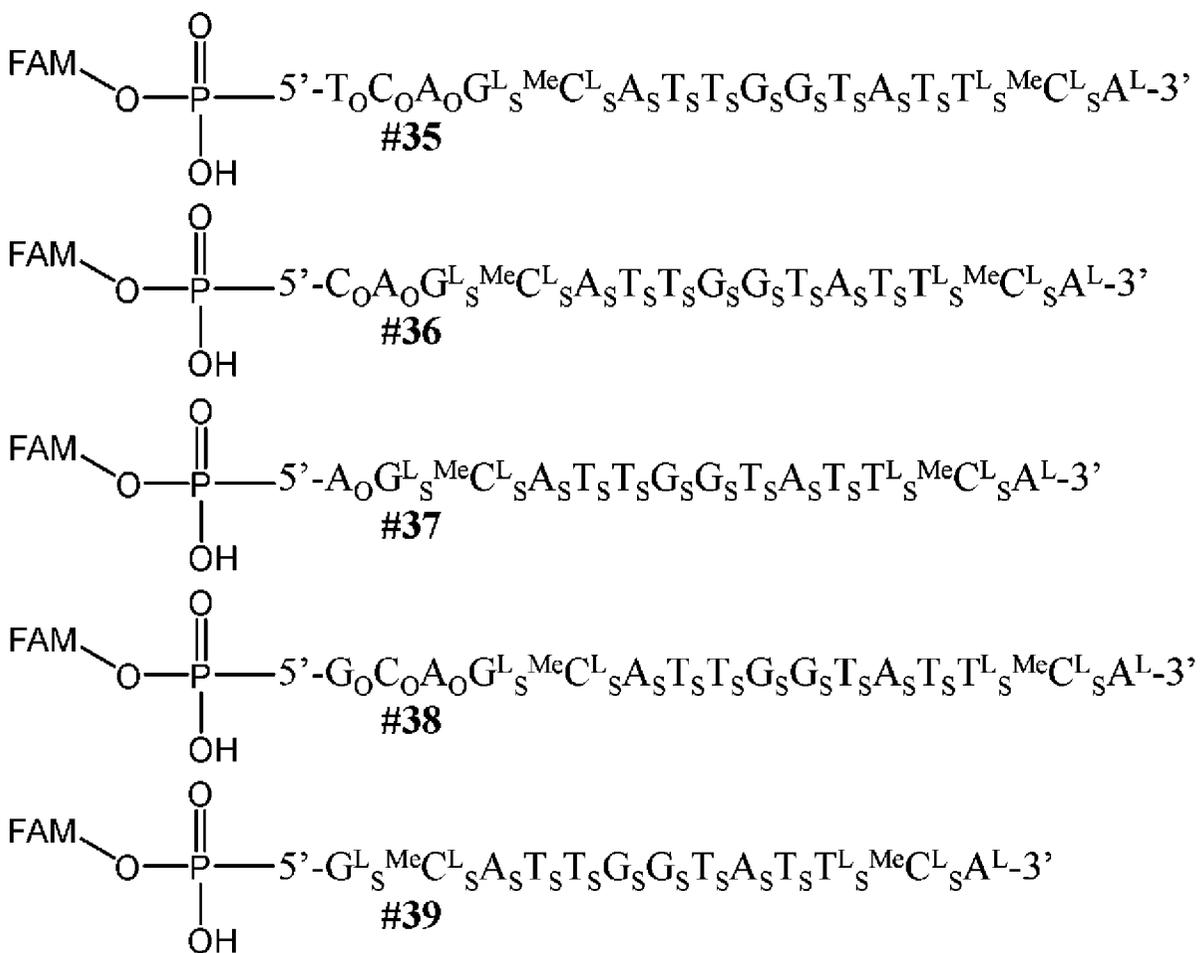


Фиг. 5С

10/41



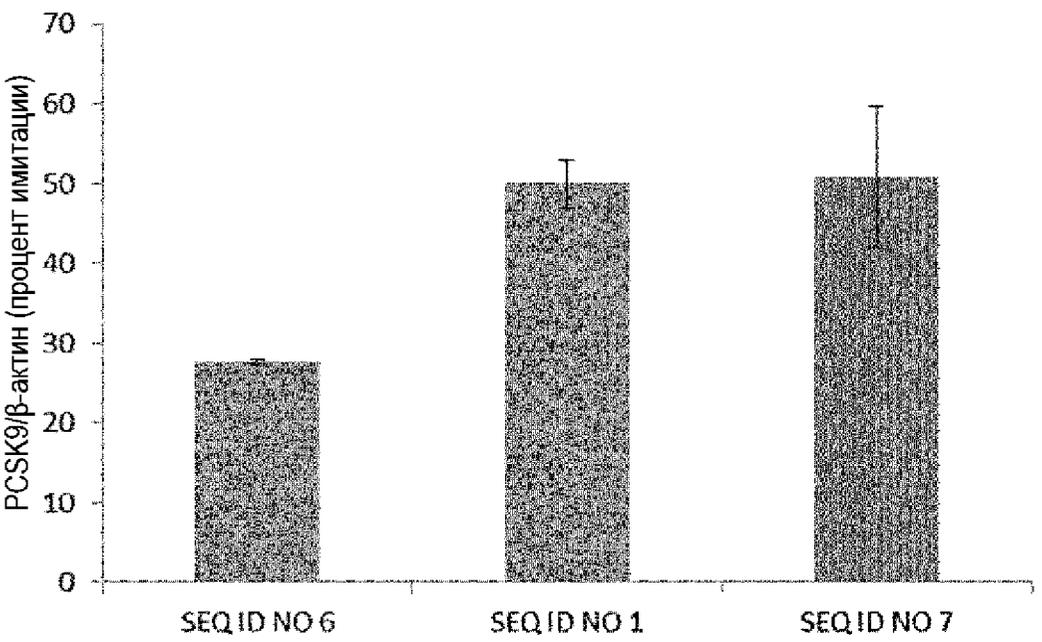
Фиг. 6



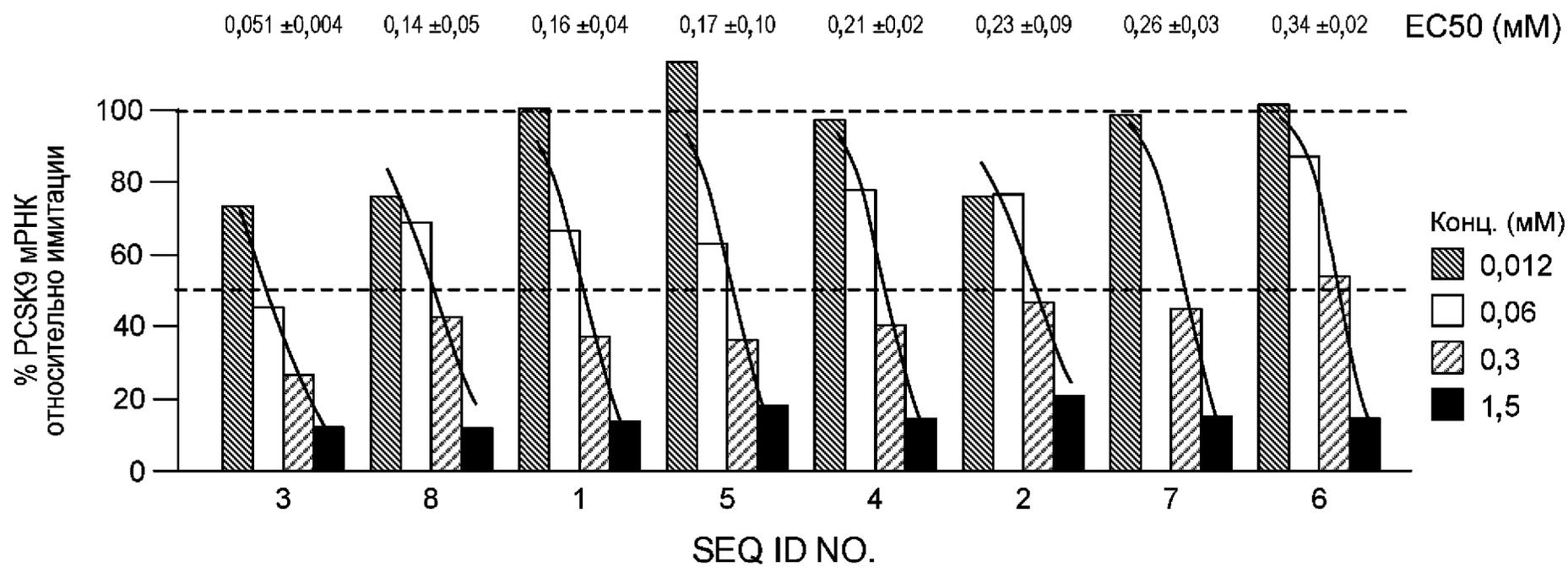
Фиг. 7



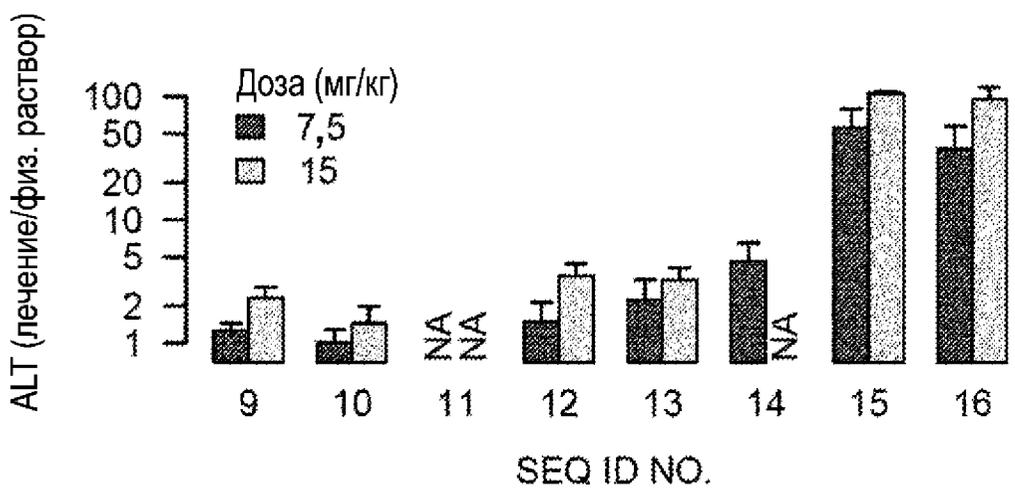
Фиг. 8



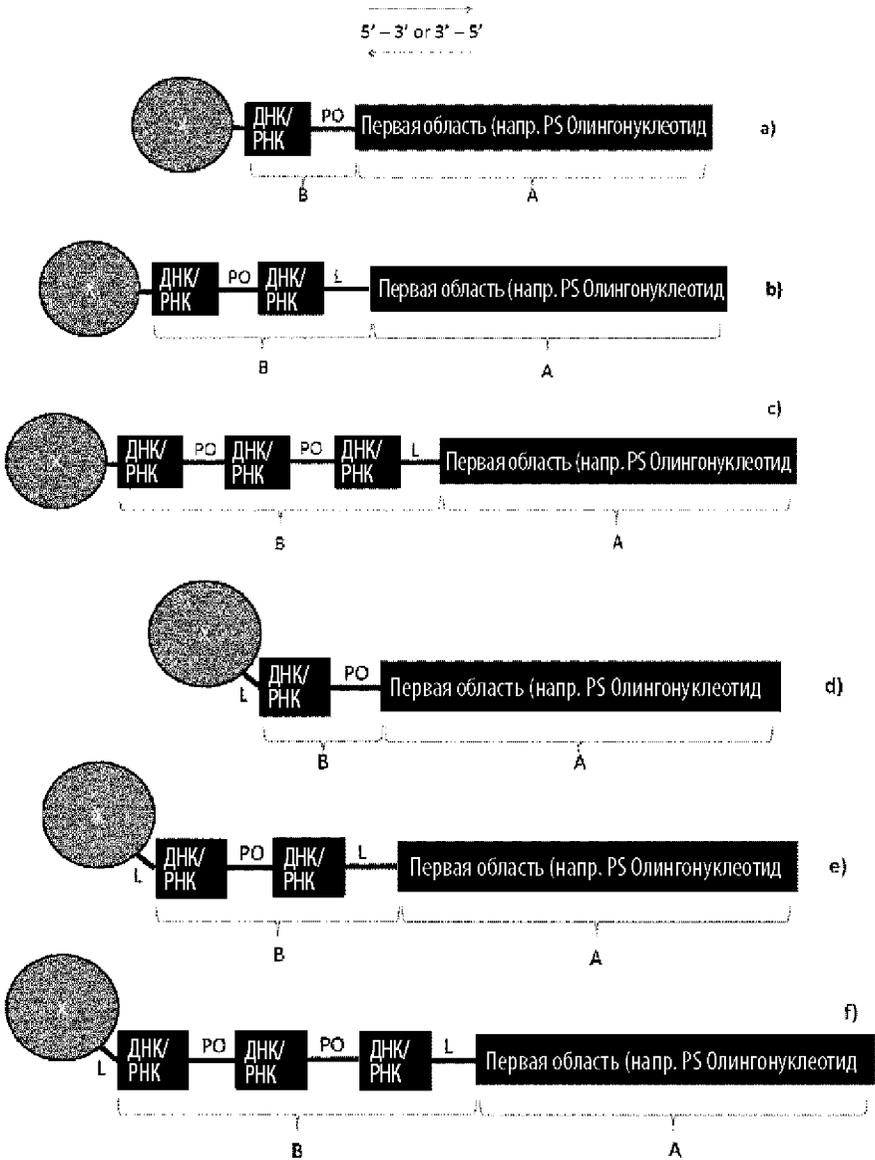
Фиг. 9



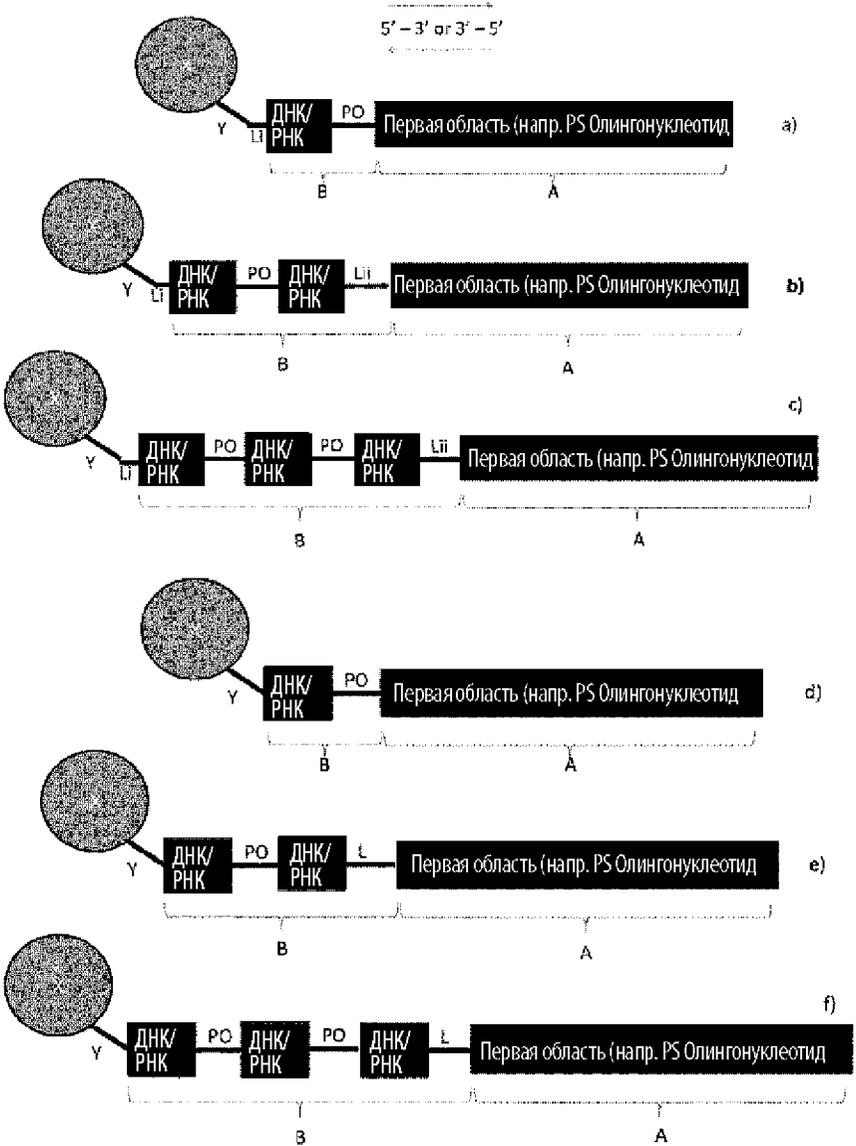
Фиг. 10



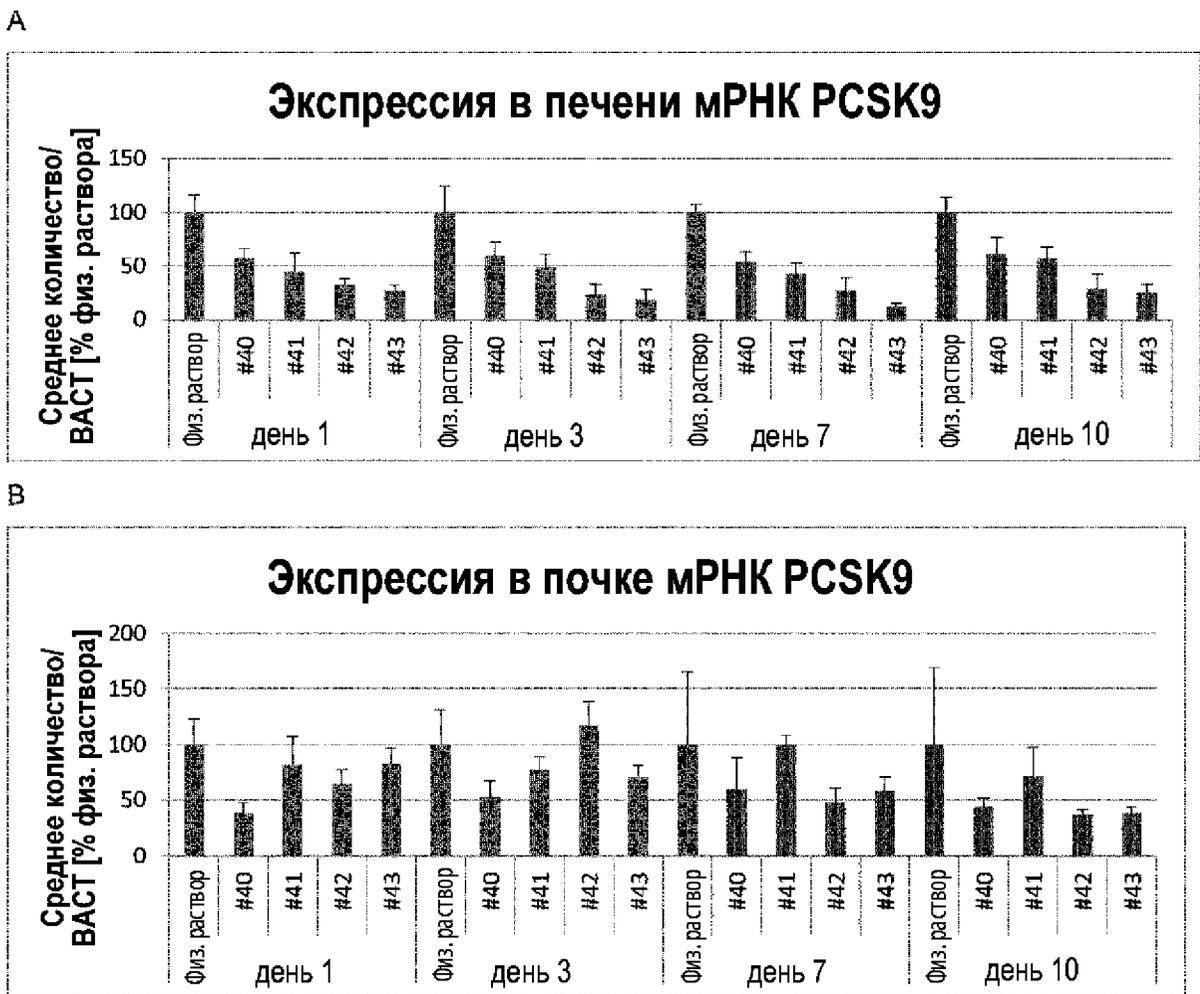
Фиг. 11



Фиг. 12

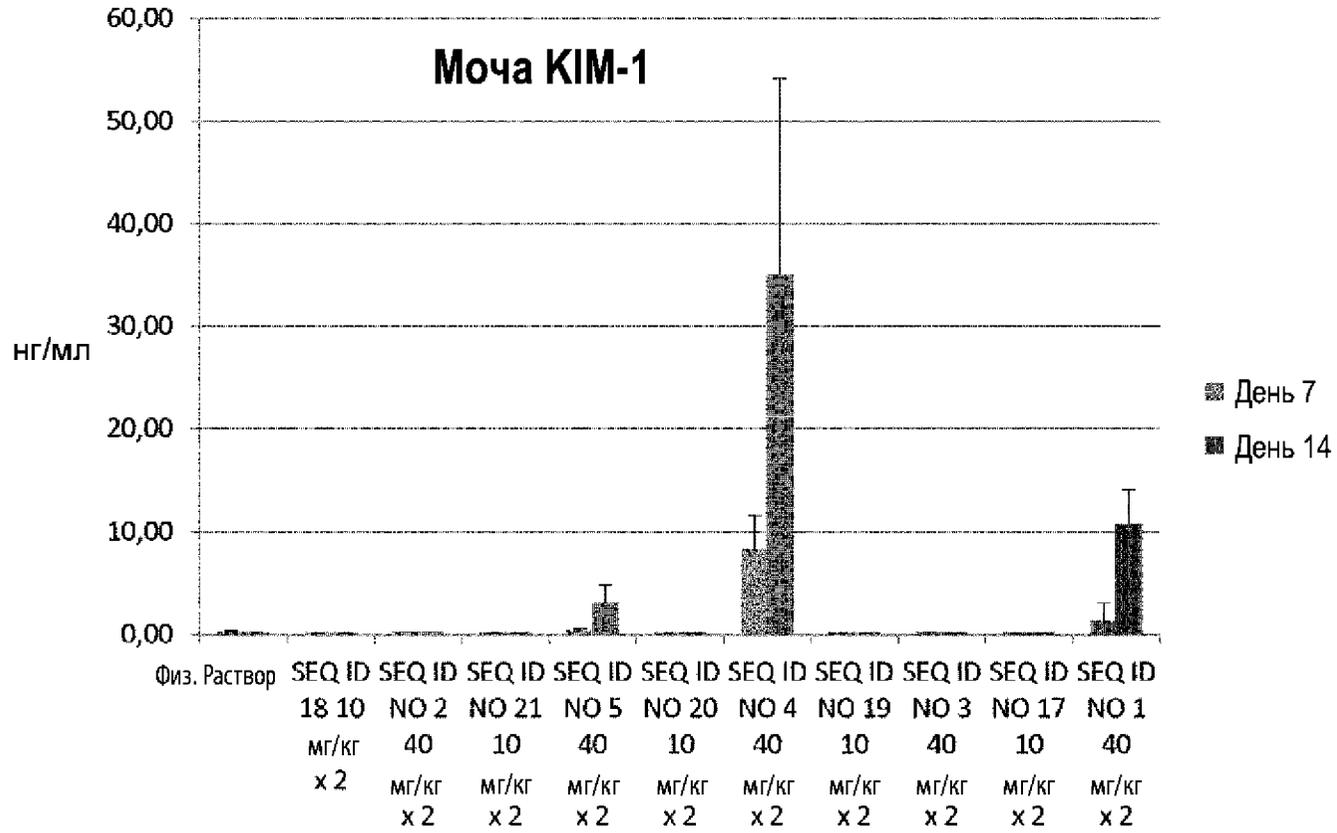


Фиг. 13



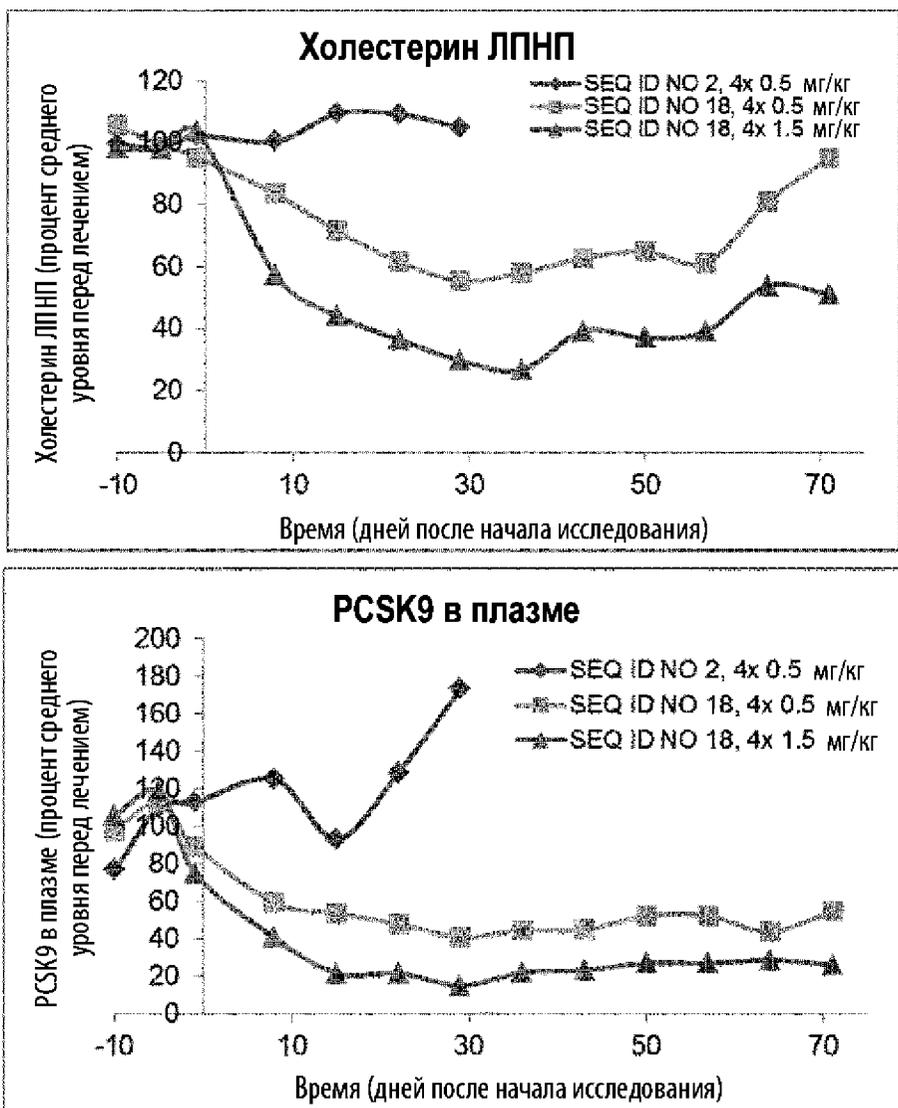
Фиг. 14

19/41

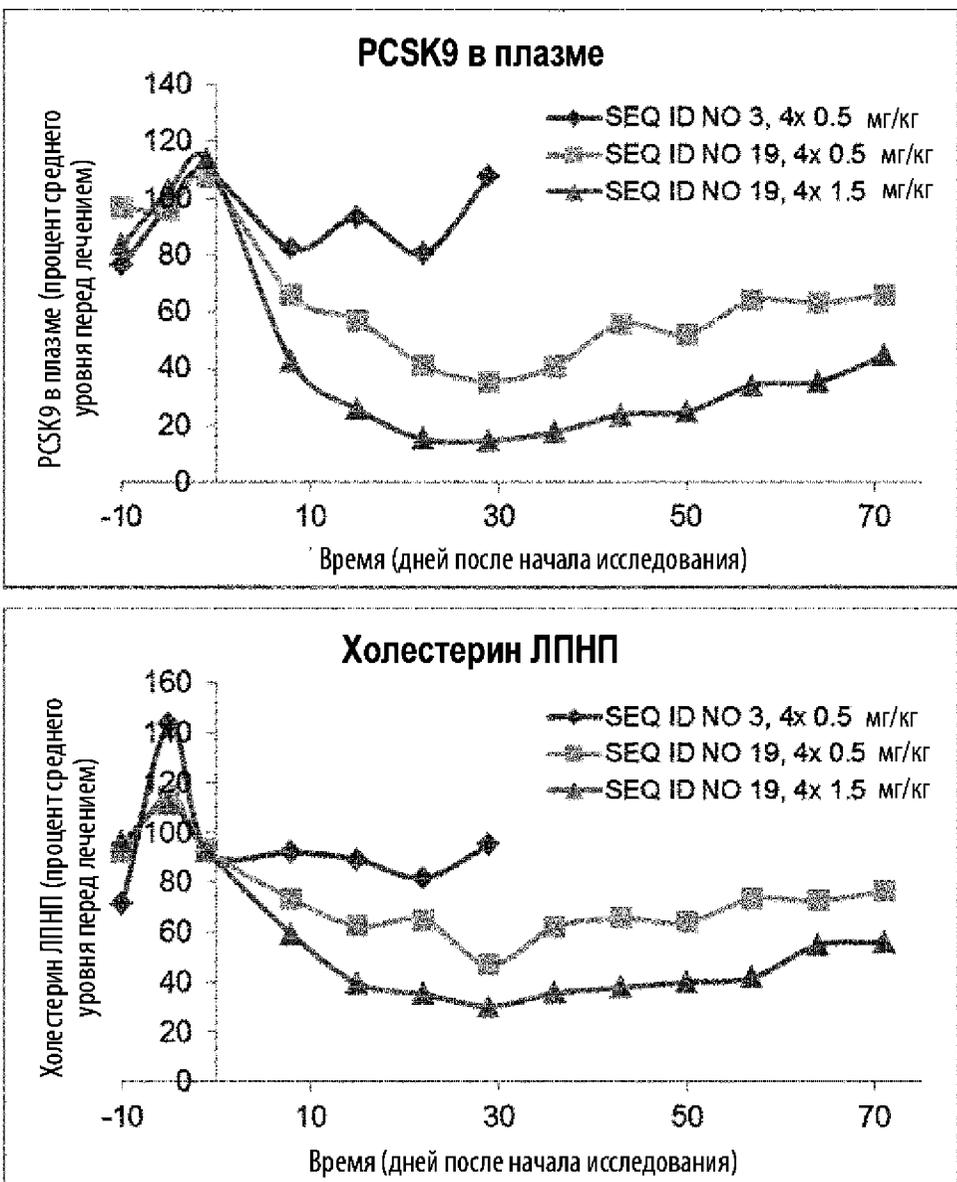


Фиг. 15

20/41



Фиг. 16



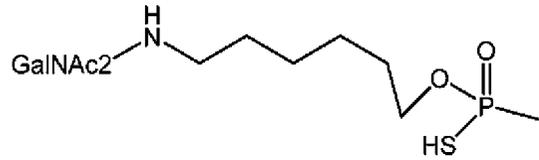
Фиг. 17

**Легенда**

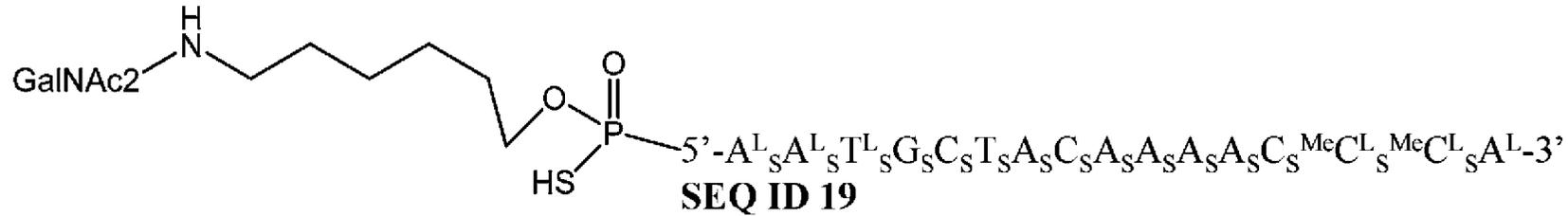
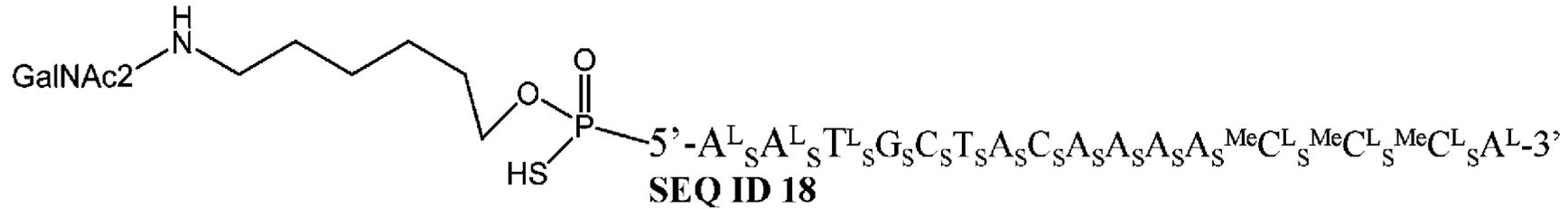
Верхний индекс <sup>L</sup> идентифицирует звено бета-D-окси LNA,

<sup>Me</sup>C идентифицирует звено 5-метилцитозина,

Нижний индекс <sub>s</sub> обозначает фосфоротиоатную межнуклеозидную связь



= фрагмент конъюгата, нацеленный на асиалогликопротеиновый рецептор Conj 2a



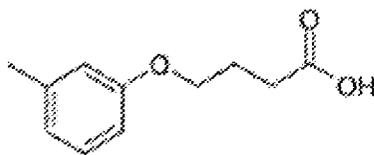
22/41

Фиг. 18А





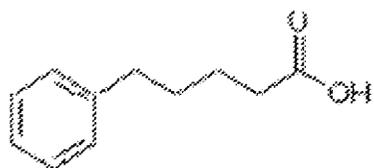
**4-HPO**  
8-(4-гидроксифенокси)октановой кислоты



**3-TBA**  
4-м-толилоксимасляная кислота



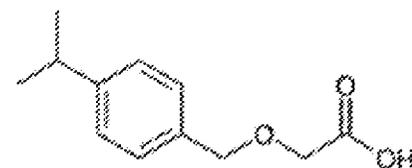
**3-HPSB**  
4-(3-гидроксифенилсульфанил)масляная кислота



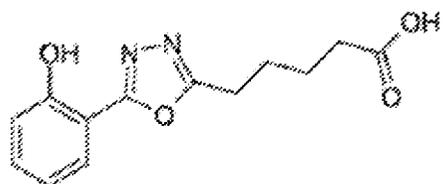
**5-PPA**  
5-фенилпентановая кислота



**2-HPOD**  
8-(2-гидроксифенокси)октилдиэтаноламин



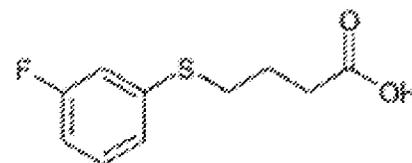
**4-IBOA**  
(4-изопропилбензилокси)уксусная кислота



**2-PHOD**  
2-(5-пентановая кислота)-5-(2-гидроксифенил)-1,3,4-оксадиазол



**7-OPHA**  
7-оксо-7-фенилгептановая кислота



**3-FPSB**  
4-(3-фторфенилсульфанил)масляная кислота

Фиг. 19

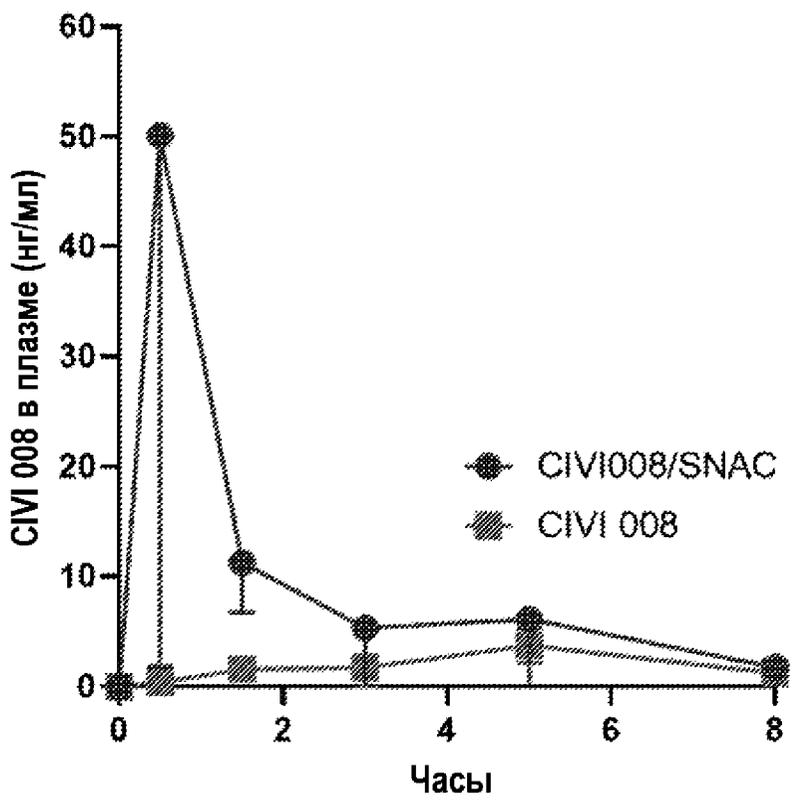
25/41



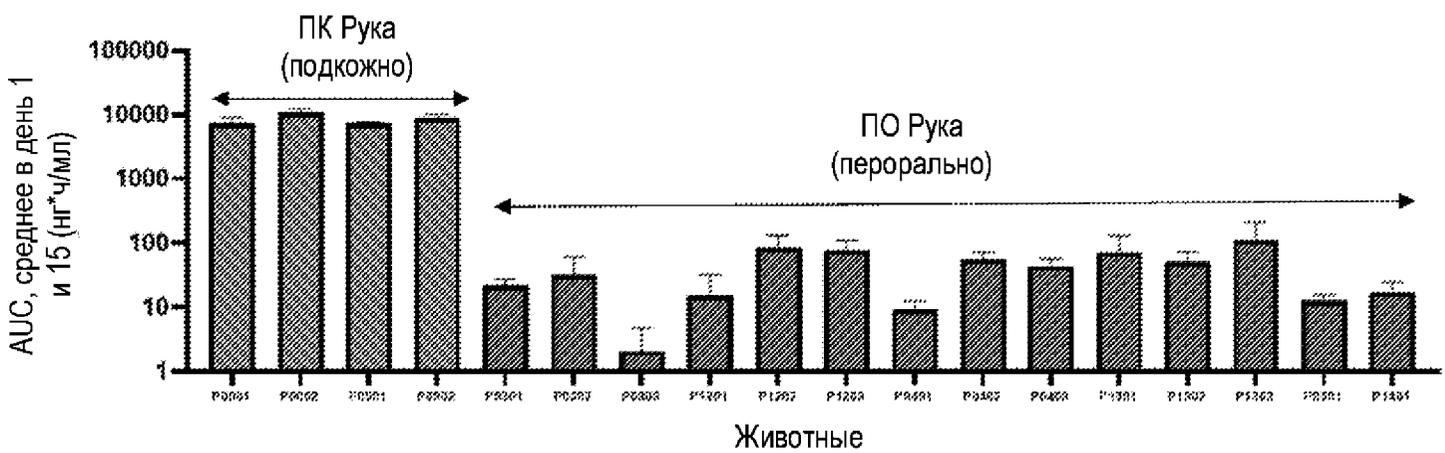
- ☐ PD: (PCSK9 и липиды) в день -7, перед введением, 4, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57 и 64
- ☐ РК: (G1-6) до введения и 0,5, 1,5, 3, 5 и 8 часов после введения в дни 1, 15 и 29
- ☐ Клиническая химия и Хематология в дни -7, перед введением, 15, 29, 43 и 64
- ☐ Клинические наблюдения: Обычные параметры + показатели повышенной подвижности кишечника (т.е. жидкий стул)

- Умерщвление: конец лечения, конец восстановления
- ☐ Гистопат: Печень/почки/ЖКТ (обширный)
- ☐ Биораспределение: Печень/почки/кишечник (двенадцатиперстная кишка, тощая кишка, подвздошная кишка и толстая кишка)

Фиг. 20



Фиг. 21

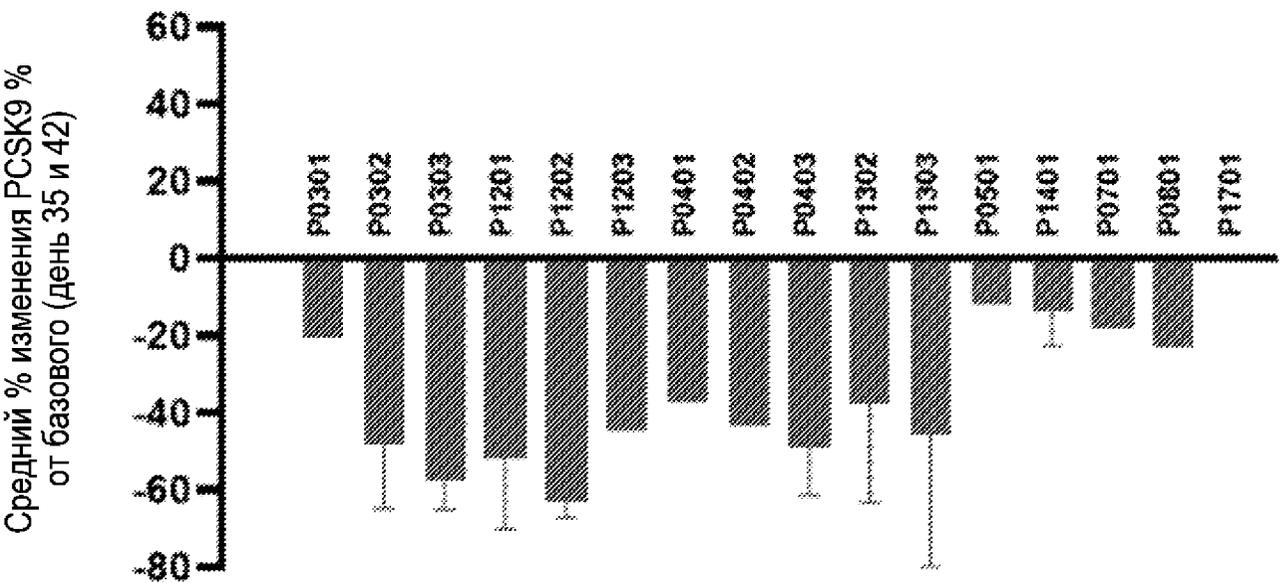


Фиг. 22

Группа лечения	Окончание лечения (мкг/грамм ткани)	Окончание восстановления (мкг/грамм ткани)
SQ Q2W x 3	33,8 (19,1)	N.A.
1 капсула QD x 42	2,3 (1,2)	0,6 (0,2)
2 капсулы QD x 42	4,0 (1,6)	0,9 (0,7)

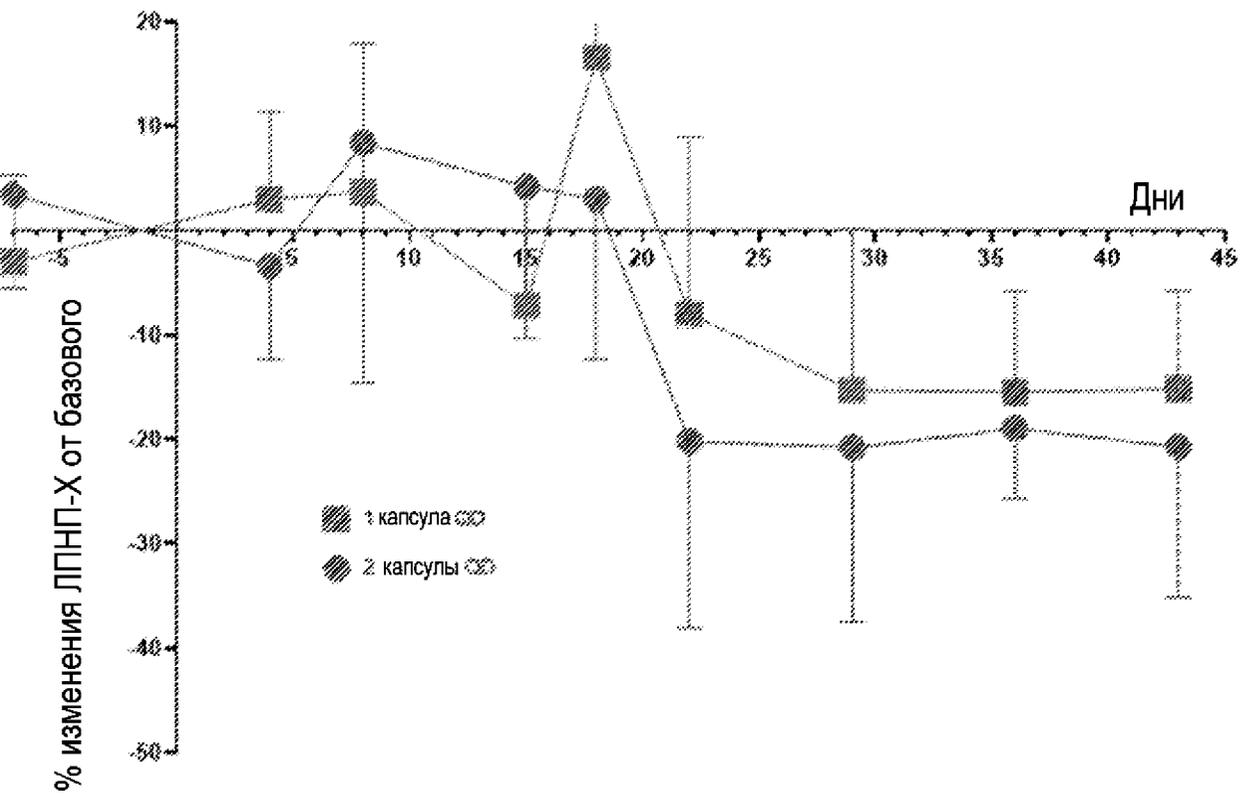
Фиг. 23

29/41

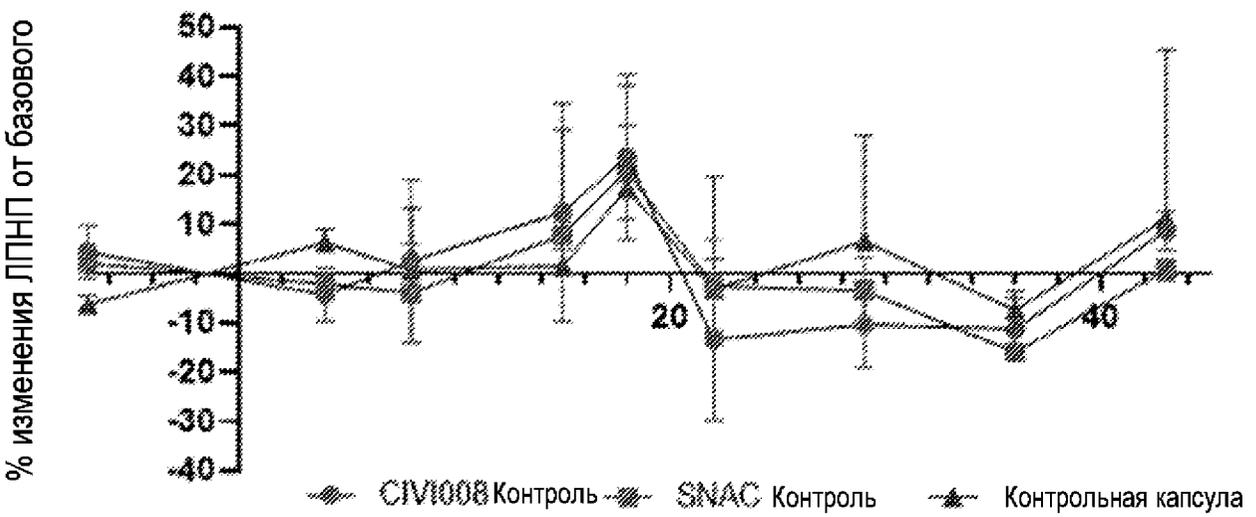


Фиг. 24

30/41

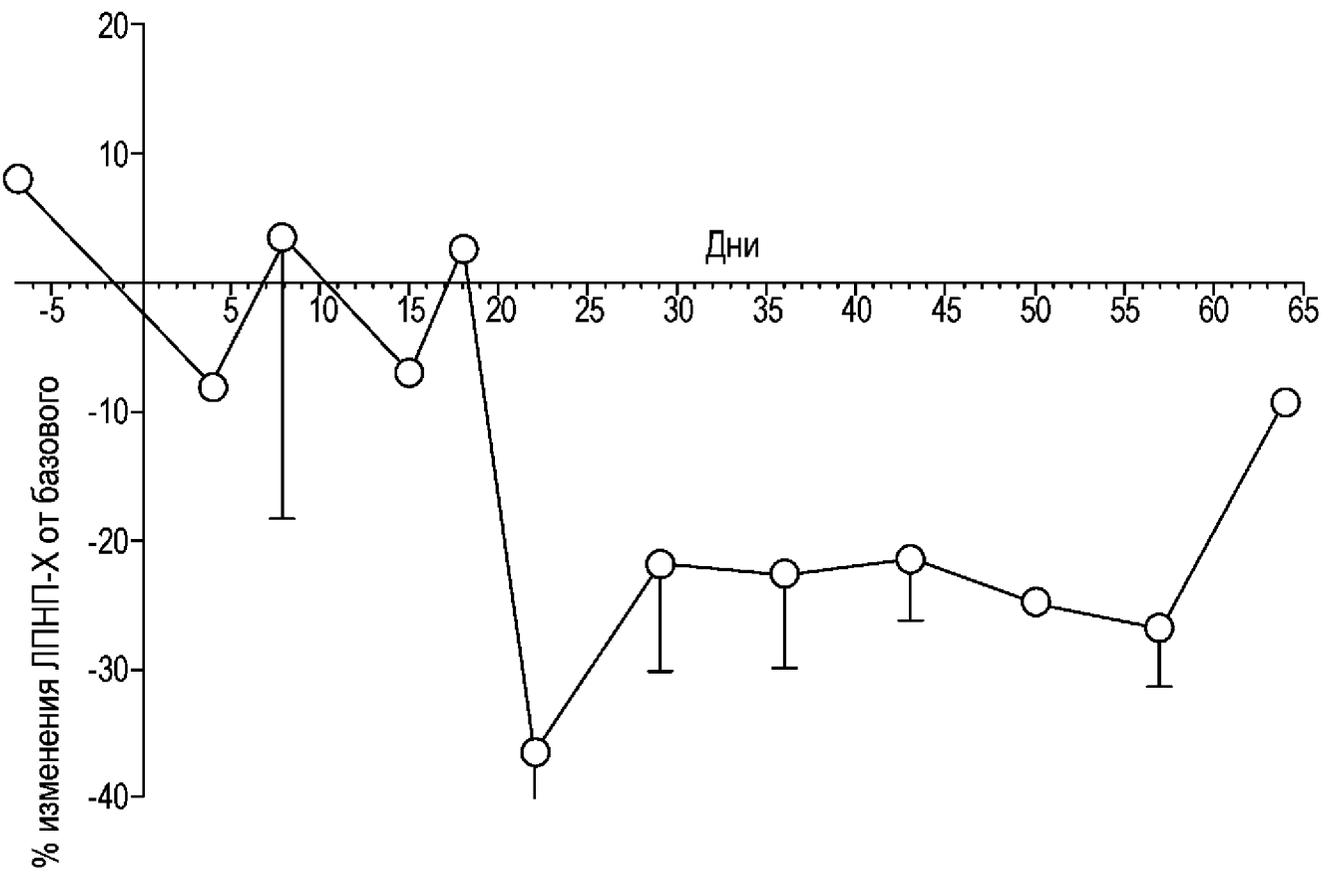


Фиг. 25А

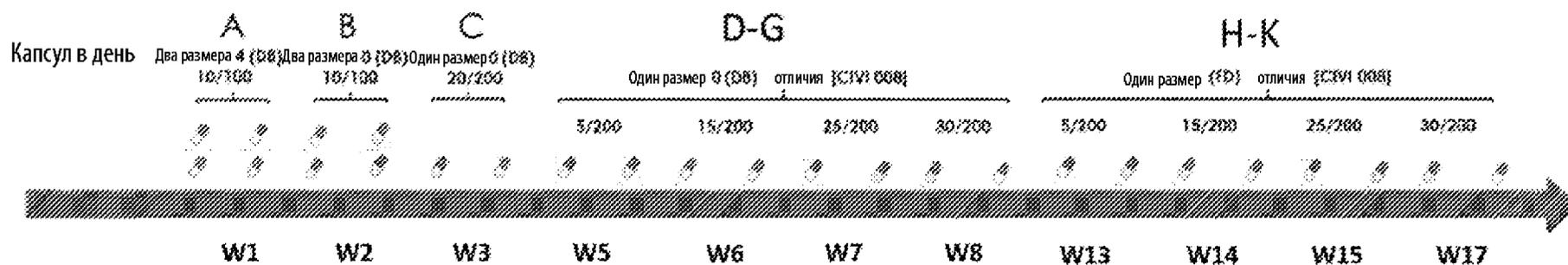


Фиг. 25В

32/41



Фиг. 26



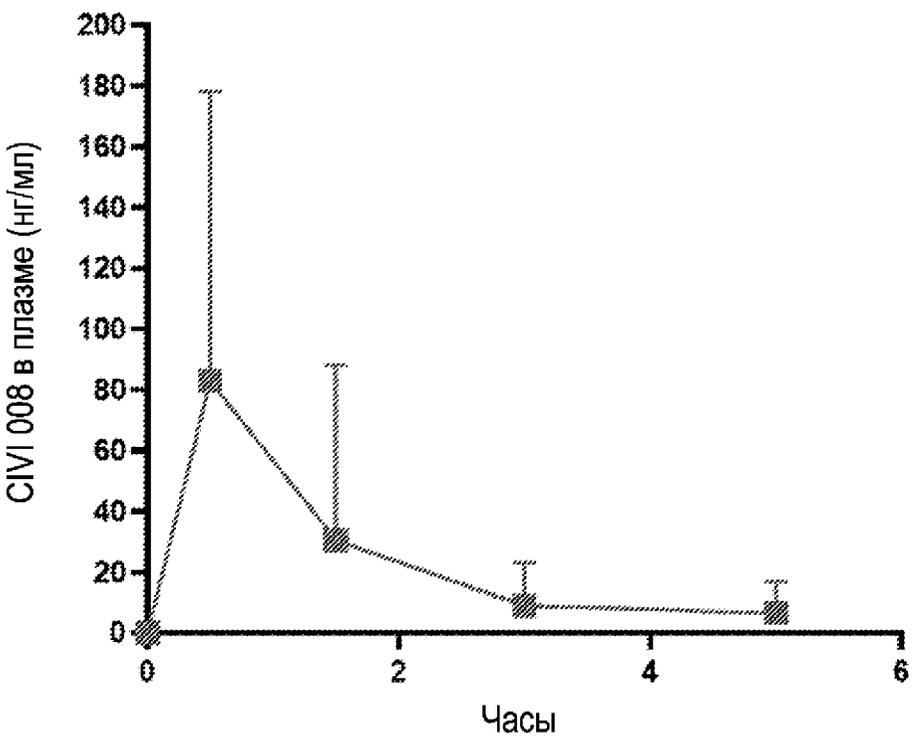
33/41

Животные: 10 неинвазивных ННР (5м/5Ф)  
 РК: до введения и 0,5, 1,5, 3 и 5 часов после введения в дни введения  
 Клинические наблюдения: 2 раза в неделю.  
 Клиническая химия: дни -7 и конец введения

Фиг. 27

ПЕРОРАЛЬНАЯ ДОСТАВКА АНТИСМЫСЛОВЫХ КОНЬЮГАТОВ,  
НАЦЕЛЕННЫХ НА РССК9

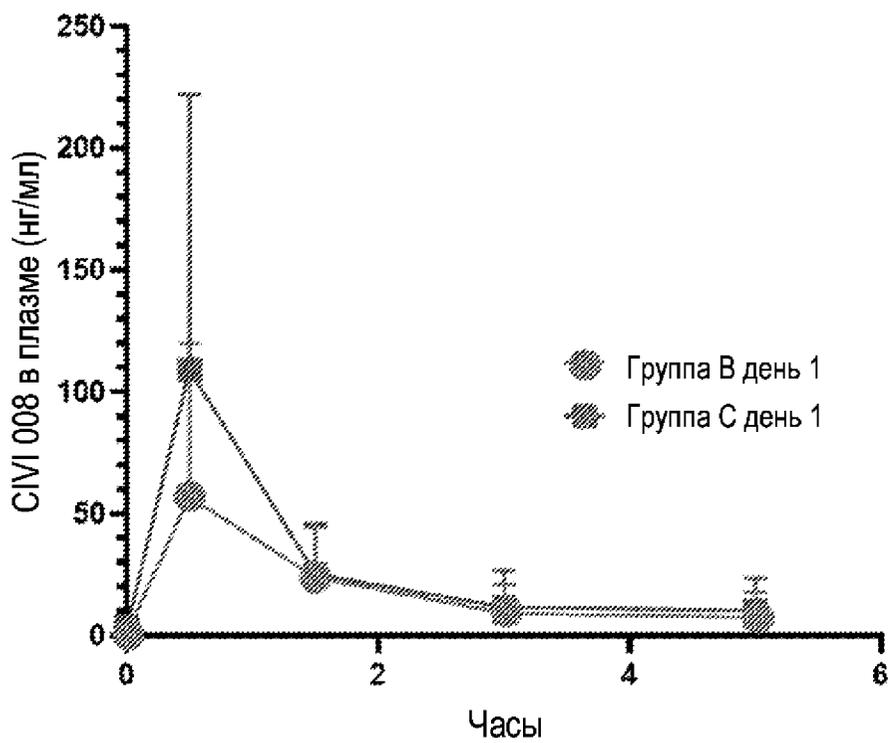
34/41



Фиг. 28

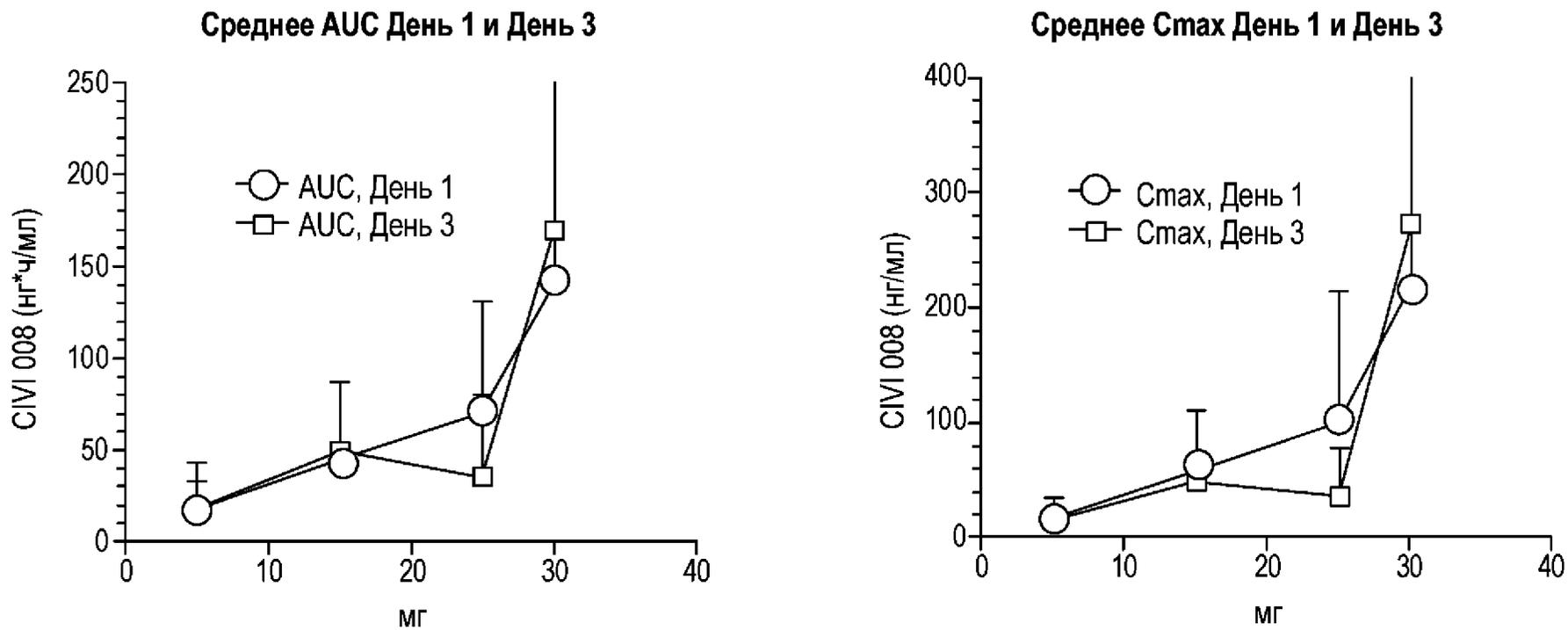
	Кол. ЖИВОТНЫХ	Среднее AUC <sub>0-5</sub> (нг*мл*ч)	SD	Среднее C <sub>max</sub> (нг/мл)	SD
CIVI008/SNAC	6	67,1	50,7	50,7	52,3
CIVI008/5-CNAC	10	122,5	98,6	106,9	91,2

Фиг. 29



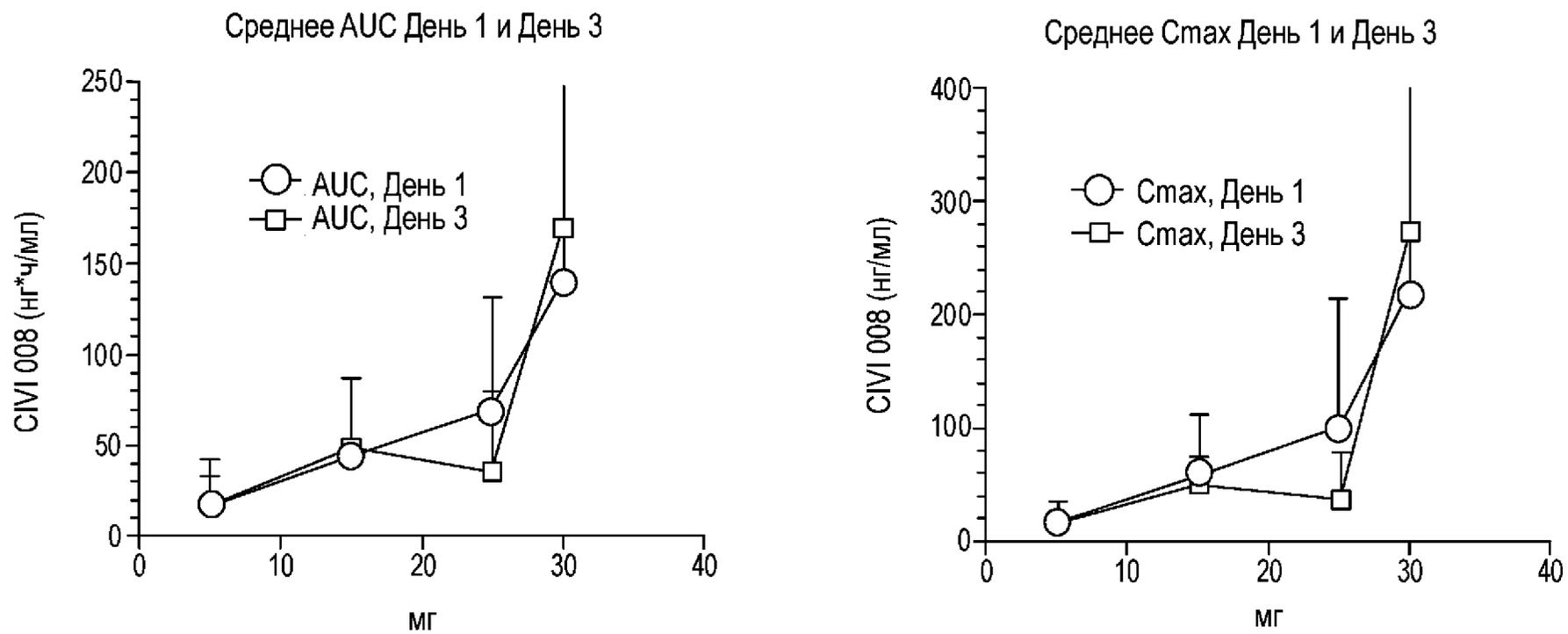
	Кол. Капсул	Кол. Животных	Среднее AUC <sub>0-5</sub> (нг*мл*ч)	SD	Среднее C <sub>max</sub> (нг/мл)	SD
Группа В	2	10	97.0	87.9	60.8	64.5
Группа С	1	10	144.8	101.2	116.9	114.1

Фиг. 30



Фиг. 31

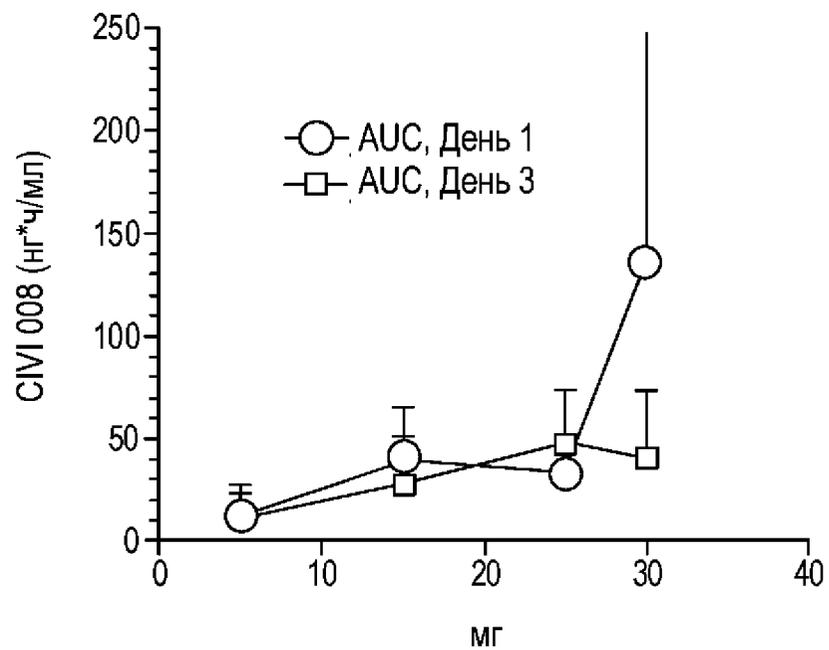
Сухая смесь



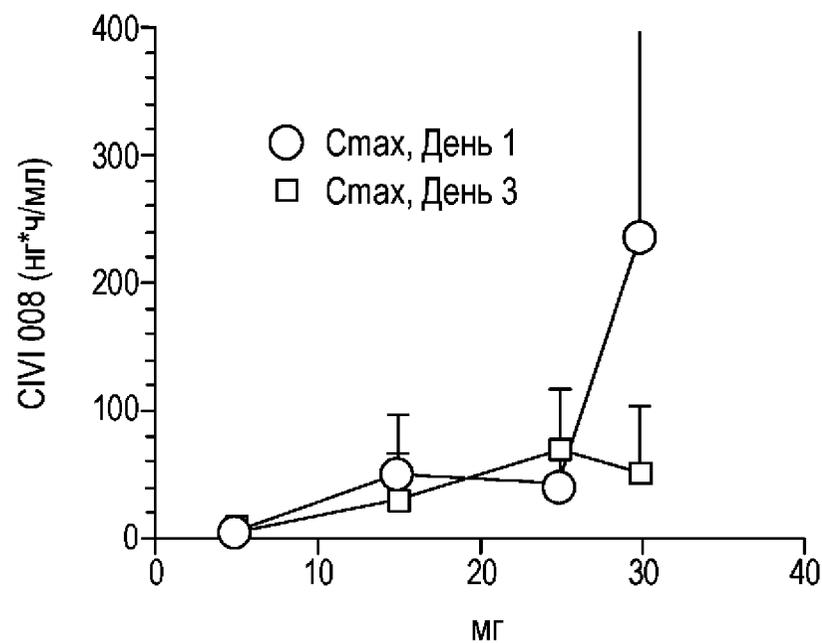
Фиг. 32А

### Лиофилизация

Среднее AUC День 1 и День 3



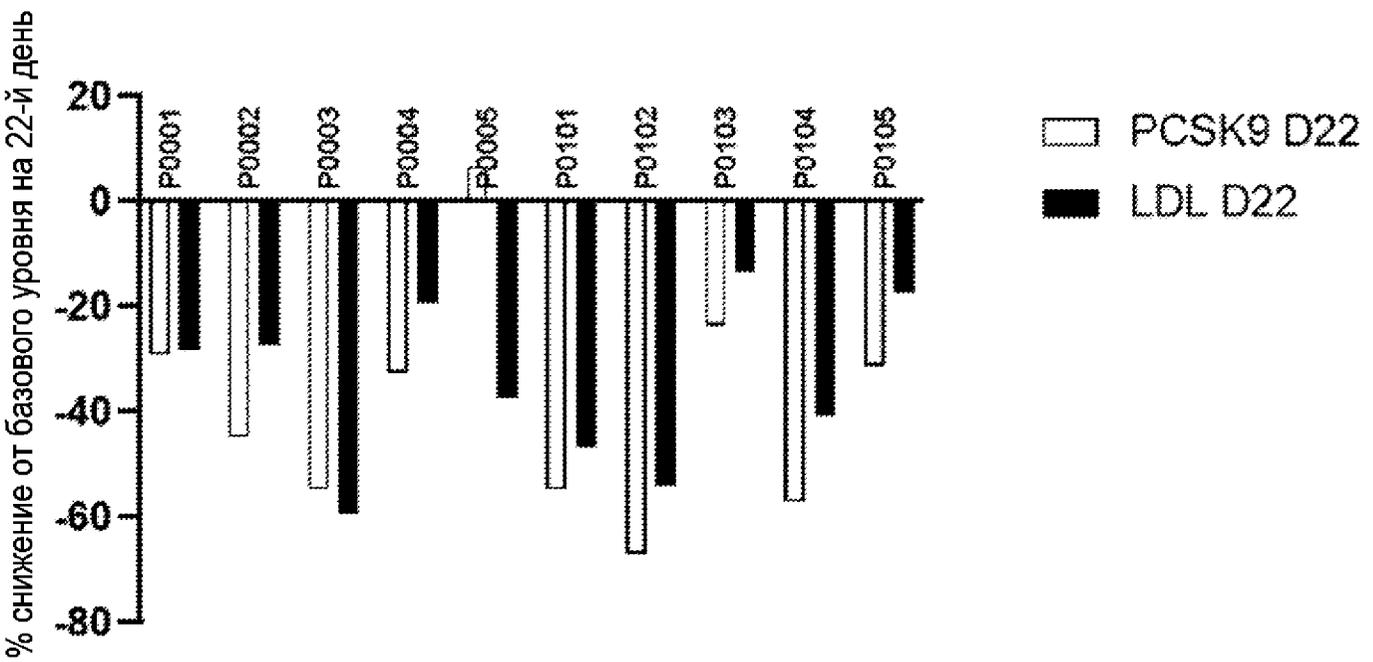
Среднее C<sub>max</sub> День 1 и День 3



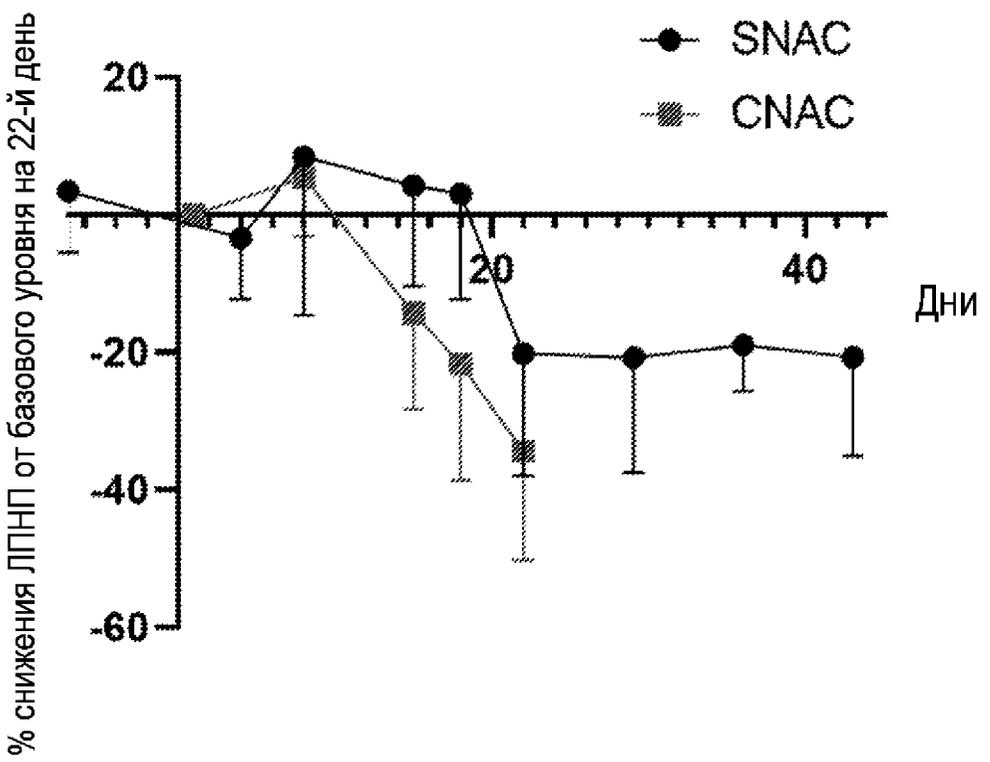
Фиг. 32В

ПЕРОРАЛЬНАЯ ДОСТАВКА АНТИСМЫСЛОВЫХ КОНЪЮГАТОВ,  
НАЦЕЛЕННЫХ НА PCSK9

40/41



Фиг. 33



Фиг. 34