

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 042765

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2023.03.22

(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)

(21) Номер заявки  
201992170

(22) Дата подачи заявки  
2018.03.23

(54) МОДУЛЯТОРЫ ЭКСПРЕССИИ PCSK9

(31) 62/476,051

(56) US-A1-20160017323  
WO-A2-2009148605

(32) 2017.03.24

(33) US

(43) 2020.03.16

(86) PCT/US2018/023936

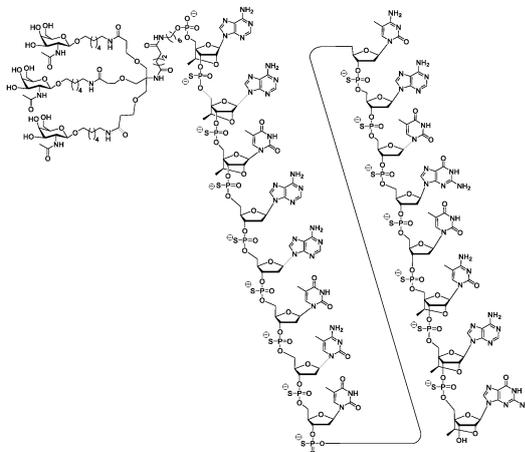
(87) WO 2018/175839 2018.09.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
АЙОНИС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Суэйзи Эрик И., Фрейер Сьюзан М.,  
Бый Хюнх-Хоа (US)

(74) Представитель:  
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев  
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)

(57) В изобретении предложены соединения, состоящие из модифицированного олигонуклеотида формулы



или содержащие его, а также применение данных соединений для лечения, предупреждения или уменьшения выраженности заболевания, ассоциированного с PCSK9.

B1

042765

042765

B1

### Перечень последовательностей

Изобретение подается вместе с перечнем последовательностей в электронной форме. Перечень последовательностей представлен в виде файла под названием 200615-WO-PCT-SequenceListing.txt, созданного 16 февраля 2018 г., размер которого составляет 431 кБ. Информация из перечня последовательностей в электронной форме включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### Область техники

В вариантах осуществления настоящего изобретения предусматриваются соединения, применимые для подавления экспрессии пропротеинконвертазы субтилизин/кексин 9 типа (PCSK9) и в некоторых случаях снижения количества белка PCSK9 в клетке или у животного, что может быть применимым для лечения, предупреждения или уменьшения выраженности заболевания, ассоциированного с PCSK9.

### Предпосылки изобретения

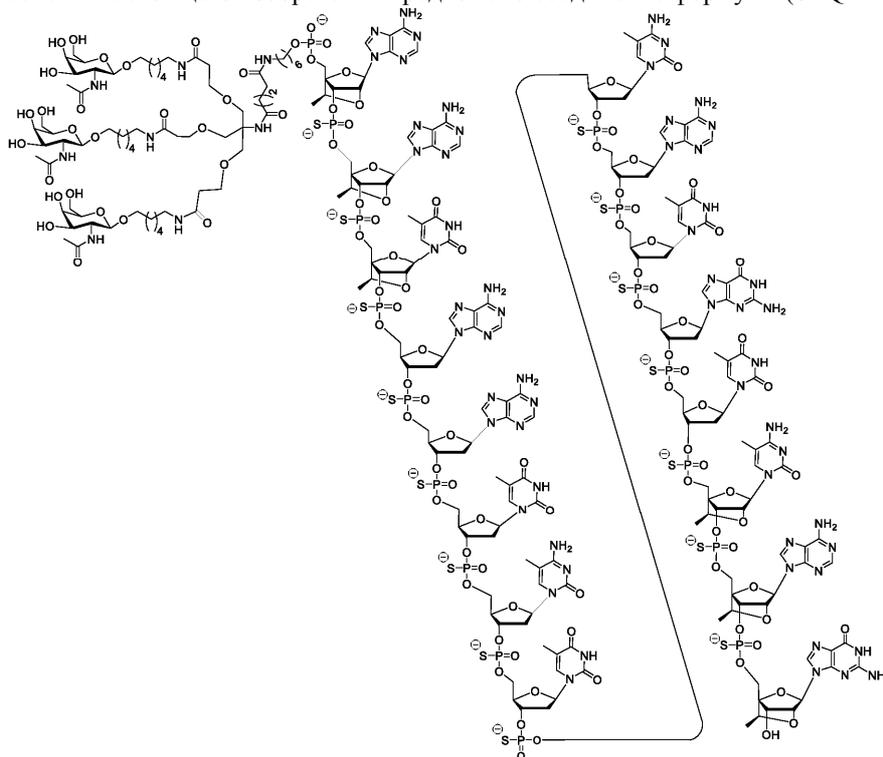
Пропропротеинконвертаза субтилизин/кексин 9 типа (PCSK9) представляет собой фермент, играющий важную роль в метаболизме липопротеинов. Редкие мутации приобретения функции в PCSK9 приводят к высокому уровню LDL-C и преждевременной ишемической болезни сердца, при этом варианты с потерей функции приводят к низкому уровню LDL-C и снижению частоты возникновения ишемической болезни сердца (Zhao et al., Am. J. Hum. Genet. 2006, 79: 514-523; Horton et al., J. Lipid Res. 2009, 50: Suppl: S172-S177). Следовательно, PCSK9 представляет собой хорошо валидированную мишень для терапии, направленной на снижение уровня холестерина LDL (Hooper et al., Expert Opin. Biol. Ther. 2013, 13: 429-435).

Было продемонстрировано, что антитела алирокумаб и эволокумаб, блокирующие PCSK9, снижают уровни циркулирующей PCSK9 и понижают уровни холестерина LDL, но характеризуются малой длительностью действия, что влечет за собой необходимость частых подкожных инъекций (Zhang et al., BMC Med. 2015, 13: 123; Navarese et al., Ann. Intern. Med. 2015, 163: 40-51).

Целью, определенной в данном документе, является обеспечение соединений, способов и фармацевтических композиций для улучшенного лечения заболеваний, таких как сердечно-сосудистые заболевания, формы дислипидемии, формы смешанной дислипидемии и гиперхолестеринемии.

### Краткое описание изобретения

В одном аспекте настоящего изобретения предложено соединение формулы (SEQ ID NO: 1016)



или его фармацевтически приемлемая соль. Предпочтительно фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль или собой калиевую соль.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложено соединение или его фармацевтически приемлемая соль, состоящее из модифицированного олигонуклеотида длиной 16 связанных нуклеозидов, имеющего нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1016, где модифицированный олигонуклеотид содержит:

- гэп-сегмент, состоящий из десяти связанных дезоксирибонуклеозидов;
- 5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов; и
- 3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов;

где гЭп-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, где каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит сЕт-сахар; где каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную связь; и где каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложено соединение или его фармацевтически приемлемая соль, содержащее модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов, который имеет последовательность нуклеиновых оснований, состоящую из SEQ ID NO: 1016, где модифицированный олигонуклеотид содержит:

гЭп-сегмент, состоящий из связанных дезоксинуклеозидов;

5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из связанных нуклеозидов; и

3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из связанных нуклеозидов;

где гЭп-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, где 5'-концевой фланговый сегмент и 3'-концевой фланговый сегмент содержат сЕт-сахара; где каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную связь; и где каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложено применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из вышеуказанных аспектов в терапии, в частности в лечении, предупреждении или уменьшении выраженности заболевания, ассоциированного с PCSK9, например где заболевание представляет собой гиперхолестеринемию, дислипидемию или смешанную дислипидемию.

Определенные варианты осуществления, предусматриваемые в данном документе, направлены на соединения и композиции, которые являются более эффективными или имеют большее терапевтическое значение, чем публично раскрытые соединения.

#### **Подробное описание**

Следует понимать, что как вышеприведенное общее описание, так и нижеследующее подробное описание являются лишь иллюстративными и пояснительными и не ограничивают заявляемые варианты осуществления. В данном документе применение формы единственного числа включает форму множественного числа, если специально не указано иное. В данном документе применение "или" означает "и/или", если не указано иное. Более того, применение термина "включающий", а также других форм, таких как "включает" и "включен", не является ограничивающим.

Применяемые в данном документе заголовки разделов служат только в организационных целях и не должны пониматься как ограничивающие описываемый объект. Все документы или части документов, процитированные в настоящей заявке, включая без ограничения патенты, патентные заявки, статьи, книги, научные труды и записи эталонных последовательностей в GenBank и NCBI, настоящим явно включены посредством ссылки на части документа, обсуждаемые в данном документе, а также во всей их полноте.

Понятно, что последовательность, приведенная под каждым из SEQ ID NO в примерах, содержащихся в данном документе, не зависит от какой-либо модификации сахарного компонента, межнуклеозидной связи или нуклеинового основания. В силу этого соединения, определенные под SEQ ID NO, могут независимо содержать одну или несколько модификаций сахарного компонента, межнуклеозидной связи или нуклеинового основания. У соединений, описанных под номером ISIS, он указывает на комбинацию последовательности нуклеиновых оснований, химической модификации и мотива.

#### **Определения**

Если не указано иное, следующие термины имеют следующие значения.

"2'-дезоксинуклеозид" означает нуклеозид, содержащий 2'-Н(Н)-фуранозильный сахарный компонент, обнаруживаемый во встречающихся в природе дезоксирибонуклеиновых кислотах (ДНК). В определенных вариантах осуществления 2'-дезоксинуклеозид может содержать модифицированное нуклеиновое основание или может содержать нуклеиновое основание РНК (урацил).

"2'-О-метоксиэтил" (также 2'-МОЕ и 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub>) относится к О-метоксиэтильной модификации в 2'-положении фуранозильного кольца. 2'-О-метоксиэтил-модифицированный сахар является модифицированным сахаром.

"2'-МОЕ-нуклеозид" (также 2'-О-метоксиэтилнуклеозид) означает нуклеозид, содержащий 2'-МОЕ-модифицированный сахарный компонент.

"2'-замещенный нуклеозид" или "2-модифицированный нуклеозид" означает нуклеозид, содержащий 2'-замещенный или 2'-модифицированный сахарный компонент. Как используется в данном документе "2'-замещенный" или "2-модифицированный" применительно к сахарному компоненту означает, что сахарный компонент содержит по меньшей мере одну 2'-замещающую группу, отличную от Н или ОН.

"3'-концевой сайт-мишень" относится к нуклеотиду нуклеиновой кислоты-мишени, который является комплементарным самому крайнему 3'-концевому нуклеотиду конкретного соединения.

"5'-концевой сайт-мишень" относится к нуклеотиду нуклеиновой кислоты-мишени, который является комплементарным самому крайнему 5'-концевому нуклеотиду конкретного соединения.

"5'-метилцитозин" означает цитозин с присоединенной в 5'-положении метильной группой.

"Приблизительно" означает в пределах  $\pm 10\%$  от значения. Например, если указано, что "соединения осуществляли по меньшей мере приблизительно 70% подавление PCSK9", подразумевается, что уровни PCSK9 подавляются в диапазоне от 60% до 80%.

"Введение" или "осуществление введения" относится к путям введения индивидууму соединения или композиции, предусматриваемых в данном документе, для выполнения их предполагаемой функции. Пример пути введения, который можно применять, включает без ограничения парентеральное введение, такое как подкожная, внутривенная или внутримышечная инъекция или инфузия.

"Уменьшение интенсивности" относится к улучшению или ослаблению по меньшей мере одного проявления, признака или симптома ассоциированного заболевания, нарушения или состояния. В определенных вариантах осуществления уменьшение интенсивности включает задержку или замедление прогрессирования или снижение степени тяжести одного или нескольких проявлений состояния или заболевания. Прогрессирование или степень тяжести проявлений может определяться с помощью субъективных или объективных показателей, которые известны специалистам в данной области.

"Животное" относится к человеку или отличному от человека животному, в том числе без ограничения мышам, крысам, кроликам, собакам, кошкам, свиньям и отличным от человека приматам, в том числе без ограничения нечеловекообразным обезьянам и шимпанзе.

"Антисмысловая активность" означает любую поддающуюся обнаружению и/или измерению активность, связанную с гибридизацией антисмыслового соединения с его нуклеиновой кислотой-мишенью. В определенных вариантах осуществления антисмысловая активность представляет собой уменьшение количества или экспрессии нуклеиновой кислоты-мишени или белка, кодируемого такой нуклеиновой кислотой-мишенью, по сравнению с уровнями нуклеиновой кислоты-мишени или уровнями белка-мишени в отсутствие антисмыслового соединения для мишени.

"Антисмысловое соединение" означает соединение, содержащее олигонуклеотид и необязательно один или несколько дополнительных компонентов, таких как конъюгированная группа или концевая группа. Примеры антисмысловых соединений включают однонитевые и двухнитевые соединения, такие как олигонуклеотиды, рибозимы, siRNA, shRNA, ssRNA и соединения, активность которых зависит от степени занятости активных центров.

"Антисмысловое подавление" означает снижение уровней нуклеиновой кислоты-мишени в присутствии антисмыслового соединения, комплементарного нуклеиновой кислоте-мишени, по сравнению с уровнями нуклеиновой кислоты-мишени в отсутствие антисмыслового соединения.

"Антисмысловые механизмы" представляют собой все такие механизмы, предполагающие гибридизацию соединения с нуклеиновой кислотой-мишенью, где результатом или эффектом гибридизации является либо разрушение мишени, либо занятие мишени с сопутствующей блокировкой клеточного механизма, предполагающего, например, транскрипцию или сплайсинг.

"Антисмысловый олигонуклеотид" означает олигонуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную нуклеиновой кислоте-мишени или ее области или сегменту. В определенных вариантах осуществления антисмысловый олигонуклеотид способен к специфической гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью или ее областью или сегментом.

"Бициклический нуклеозид" или "BNA" означает нуклеозид, содержащий бициклический сахарный компонент. "Бициклический сахар" или "бициклический сахарный компонент" означает модифицированный сахарный компонент, содержащий два кольца, где второе кольцо образовано с помощью мостика, соединяющего два атома в первом кольце, за счет чего обеспечивается образование бициклической структуры. В определенных вариантах осуществления первое кольцо бициклического сахарного компонента представляет собой фуранозильный компонент. В определенных вариантах осуществления бициклический сахарный компонент не содержит фуранозильный компонент.

"Разветвляющаяся группа" означает группу атомов с по меньшей мере 3 положениями, которые могут образовывать ковалентные связи с по меньшей мере 3 группами. В определенных вариантах осуществления разветвляющаяся группа обеспечивает несколько реакционноспособных сайтов для присоединения связанных лигандов к олигонуклеотиду с помощью конъюгирующего линкера и/или расщепляемого компонента.

"Нацеливающий на клетку компонент" означает конъюгированную группу или фрагмент конъюгированной группы, которые способны связываться с клеткой конкретного типа или с клетками конкретных типов.

"сEt" или "конформационно ограниченный этилом" означает бициклический фуранозильный сахарный компонент, содержащий мостик, соединяющий 4'-атом углерода и 2'-атом углерода, причем мостик имеет формулу: 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2'.

"сEt-нуклеозид" означает нуклеозид, содержащий сEt-модифицированный сахарный компонент.

"Химическая модификация" в соединении описывает замещения или изменения в результате химической реакции любой из структурных единиц в соединении по сравнению с исходным состоянием такой структурной единицы. "Модифицированный нуклеозид" означает нуклеозид, независимо имеющий модифицированный сахарный компонент и/или модифицированное нуклеиновое основание. "Модифицированный олигонуклеотид" означает олигонуклеотид, содержащий по меньшей мере одну модифицирован-

ную межнуклеозидную связь, модифицированный сахар и/или модифицированное нуклеиновое основание.

"Химически отличная область" относится к области соединения, которая некоторым образом химически отличается от другой области того же самого соединения. Например, область с 2'-О-метоксиэтилнуклеотидами химически отличается от области с нуклеотидами без 2'-О-метоксиэтильных модификаций.

"Химерные антисмысловые соединения" означают антисмысловые соединения, которые имеют по меньшей мере 2 химически отличные области, при этом на каждое положение приходится несколько субъединиц.

"Расщепляемая связь" означает любую химическую связь, которая может быть разорвана. В определенных вариантах осуществления расщепляемая связь выбрана из амидной, полиамидной, сложноэфирной, эфирной, одной или обеих сложноэфирных в фосфодиэфирной связи, фосфоэфирной, карбаматной, дисульфидной или пептидной.

"Расщепляемый компонент" означает связь или группу атомов, которые расщепляются в физиологических условиях, например, внутри клетки, животного или человека.

"Комплементарный" применительно к олигонуклеотиду означает, что последовательность нуклеиновых оснований такого олигонуклеотида или одной или нескольких его областей соответствует последовательности нуклеиновых оснований другого олигонуклеотида или нуклеиновой кислоты или одной или нескольких их областей при выравнивании двух последовательностей нуклеиновых оснований в противоположных направлениях. Описанные в данном документе совпадения нуклеиновых оснований или комплементарные нуклеиновые основания ограничены следующими парами: аденин (А) и тимин (Т), аденин (А) и урацил (U), цитозин (С) и гуанин (G) и 5-метилцитозин (<sup>m</sup>С) и гуанин (G), если не указано иное. Комплементарные олигонуклеотиды и/или нуклеиновые кислоты не должны характеризоваться комплементарностью нуклеиновых оснований по каждому нуклеозиду и могут содержать одно или несколько несовпадений нуклеиновых оснований. В отличие от этого, "полностью комплементарные" или "на 100% комплементарные" применительно к олигонуклеотидам означает, что такие олигонуклеотиды характеризуются совпадениями нуклеиновых оснований по каждому нуклеозиду без каких-либо несовпадений нуклеиновых оснований.

"Конъюгированная группа" означает группу атомов, которая присоединена к олигонуклеотиду. Конъюгированные группы содержат конъюгированный компонент и конъюгирующий линкер, который присоединяет конъюгированный компонент к олигонуклеотиду.

"Конъюгирующий линкер" означает группу атомов, содержащую по меньшей мере одну связь, которая соединяет конъюгированный компонент с олигонуклеотидом.

"Конъюгированный компонент" означает группу атомов, которая присоединена к олигонуклеотиду посредством конъюгирующего линкера.

"Смежный" применительно к олигонуклеотиду относится к нуклеозидам, нуклеиновым основаниям, сахарным компонентам или межнуклеозидным связям, которые непосредственно примыкают друг к другу. Например, "смежные нуклеиновые основания" означают нуклеиновые основания, которые непосредственно примыкают друг к другу в последовательности.

"Конструирование" или "сконструированный для" относится к способу конструирования соединения, которое специфически гибридизируется с выбранной молекулой нуклеиновой кислоты.

"Модифицированные разными способами" означает химические модификации или химические заместители, которые отличаются друг от друга, включая отсутствие модификаций. Так, например, МОЕ-нуклеозид и немодифицированный нуклеозид ДНК являются "модифицированными разными способами", даже несмотря на то, что нуклеозид ДНК является немодифицированным. Аналогичным образом, ДНК и РНК являются "модифицированными разными способами", даже несмотря на то, что оба они представляют собой встречающиеся в природе немодифицированные нуклеозиды. Нуклеозиды, которые являются одинаковыми, но содержат различные нуклеиновые основания, не являются модифицированными разными способами. Например, нуклеозид, содержащий 2'-ОМе-модифицированный сахар и немодифицированное адениновое нуклеиновое основание, и нуклеозид, содержащий 2'-ОМе-модифицированный сахар и немодифицированное тиминовое нуклеиновое основание, не являются модифицированными разными способами.

"Двухнитевое антисмысловое соединение" означает антисмысловое соединение, содержащее два олигомерных соединения, которые являются комплементарными друг другу и формируют дуплекс, и где одно из двух указанных олигомерных соединений содержит олигонуклеотид.

"Эффективное количество" означает количество соединения, достаточное для достижения необходимого физиологического результата у индивидуума, нуждающегося в соединении. Эффективное количество может варьироваться для индивидуумов в зависимости от состояния здоровья и физического состояния индивидуума, подлежащего лечению, таксономической группы индивидуумов, подлежащих лечению, состава композиции, оценки медицинского состояния индивидуума, а также других учитываемых факторов.

"Эффективность" означает способность обеспечивать желаемый эффект.

"Экспрессия" включает все функции, посредством которых закодированная в гене информация преобразуется в присутствующие и функционирующие в клетке структуры. Такие структуры включают без ограничения продукты транскрипции и трансляции.

"Гэпмер" означает олигонуклеотид, содержащий внутреннюю область, имеющую несколько нуклеозидов, которые способствуют расщеплению под действием РНКазы H, расположенную между внешними областями, имеющими один или несколько нуклеозидов, где нуклеозиды, образующие внутреннюю область, химически отличаются от нуклеозида или нуклеозидов, образующих внешние области. Внутренняя область может называться "гэпом", а внешние области могут называться "флангами".

"Гибридизация" означает отжиг олигонуклеотидов и/или нуклеиновых кислот. Без ограничения конкретным механизмом, наиболее распространенный механизм гибридизации предполагает образование водородных связей, которое может представлять собой образование водородных связей по типу уотсон-криковского, хугстиновского или обратного хугстиновского взаимодействия между комплементарными нуклеиновыми основаниями. В определенных вариантах осуществления комплементарные молекулы нуклеиновой кислоты включают без ограничения антисмысловое соединение и нуклеиновую кислоту-мишень. В определенных вариантах осуществления комплементарные молекулы нуклеиновой кислоты включают без ограничения олигонуклеотид и нуклеиновую кислоту-мишень.

"Непосредственно примыкающий" означает, что между непосредственно примыкающими элементами одного типа отсутствуют промежуточные элементы (например, между непосредственно примыкающими нуклеиновыми основаниями отсутствуют промежуточные нуклеиновые основания).

"Индивидуум" означает человека или отличного от человека животного, выбранного для лечения или терапии.

"Подавление экспрессии или активности" относится к снижению или блокированию экспрессии или активности по сравнению с экспрессией или активностью в необработанном или контрольном образце и не обязательно указывает на полное устранение экспрессии или активности.

"Межнуклеозидная связь" означает группу или связь, которые образуют ковалентную связь между примыкающими друг к другу нуклеозидами в олигонуклеотиде. "Модифицированная межнуклеозидная связь" означает любую межнуклеозидную связь, отличную от встречающейся в природе фосфатной межнуклеозидной связи. Нефосфатные связи называются в данном документе модифицированными межнуклеозидными связями.

"Удлиненные олигонуклеотиды" представляют собой олигонуклеотиды, которые содержат один или несколько дополнительных нуклеозидов по сравнению с олигонуклеотидом, раскрытым в данном документе, например, исходным олигонуклеотидом.

"Связанные нуклеозиды" означают примыкающие друг к другу нуклеозиды, связанные между собой межнуклеозидной связью.

"Линкерный нуклеозид" означает нуклеозид, который связывает олигонуклеотид с конъюгированным компонентом. Линкерные нуклеозиды расположены в конъюгирующем линкере соединения. Линкерные нуклеозиды не считаются частью олигонуклеотидной части соединения, даже если они являются смежными с олигонуклеотидом.

"Несовпадающее" или "некомплементарное" означает нуклеиновое основание первого олигонуклеотида, которое не является комплементарным соответствующему нуклеотидному основанию второго олигонуклеотида или нуклеиновой кислоты-мишени при выравнивании первого и второго олигонуклеотидов. Например, нуклеиновые основания, в том числе без ограничения универсальные нуклеиновые основания инозин и гипоксантин, способны гибридизоваться с по меньшей мере одним нуклеиновым основанием, но тем не менее являются несовпадающими или некомплементарными относительно нуклеинового основания, с которым они гибридизируются. В качестве другого примера, нуклеиновое основание первого олигонуклеотида, которое не способно гибридизоваться с соответствующим нуклеиновым основанием второго олигонуклеотида или нуклеиновой кислоты-мишени, при выравнивании первого и второго олигонуклеотидов является несовпадающим или некомплементарным нуклеиновым основанием.

"Модулирование" относится к изменению или корректировке признака в клетке, ткани, органе или организме. Например, модулирование РНК PCSK9 может означать увеличение или уменьшение уровня РНК PCSK9 и/или белка PCSK9 в клетке, ткани, органе или организме. "Модулятор" осуществляет изменение в клетке, ткани, органе или организме. Например, соединением для PCSK9 может быть модулятор, который обеспечивает уменьшение количества РНК PCSK9 и/или белка PCSK9 в клетке, ткани, органе или организме.

"МОЕ" означает метоксиэтил.

"Мономер" относится к одной структурной единице олигомера. Мономеры включают без ограничения нуклеозиды и нуклеотиды.

"Мотив" означает характерный участок из немодифицированных и/или модифицированных сахарных компонентов, нуклеиновых оснований и/или межнуклеозидных связей в олигонуклеотиде.

"Природные" или "встречающиеся в природе" средства обнаруживаются в природе.

"Небициклический модифицированный сахар" или "небициклический модифицированный сахар-

ный компонент" означает модифицированный сахарный компонент, который содержит модификацию, такую как заместитель, который не образует мостик между двумя атомами сахара с образованием второго кольца.

"Нуклеиновая кислота" относится к молекулам, состоящим из мономерных нуклеотидов. Нуклеиновая кислота включает без ограничения рибонуклеиновые кислоты (РНК), дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), одонитевые нуклеиновые кислоты и двухнитевые нуклеиновые кислоты.

"Нуклеиновое основание" означает гетероциклический компонент, способный к спариванию с основанием другой нуклеиновой кислоты. Как используется в данном документе, "встречающееся в природе нуклеиновое основание" представляет собой аденин (А), тимин (Т), цитозин (С), урацил (U) и гуанин (G). "Модифицированное нуклеиновое основание" представляет собой встречающееся в природе нуклеиновое основание, которое является химически модифицированным. "Универсальное основание" или "универсальное нуклеиновое основание" представляет собой нуклеиновое основание, отличное от встречающегося в природе нуклеинового основания и модифицированного нуклеинового основания и способное к спариванию с любым нуклеиновым основанием.

"Последовательность нуклеиновых оснований" означает порядок расположения смежных нуклеиновых оснований в нуклеиновой кислоте или олигонуклеотиде независимо от какого-либо сахара или межнуклеозидной связи.

"Нуклеозид" означает соединение, содержащее нуклеиновое основание и сахарный компонент. Нуклеиновое основание и сахарный компонент независимо друг от друга являются немодифицированными или модифицированными.

"Модифицированный нуклеозид" означает нуклеозид, содержащий модифицированное нуклеиновое основание и/или модифицированный сахарный компонент. Модифицированные нуклеозиды включают в себя нуклеозиды с удаленными азотистыми основаниями, у которых отсутствует нуклеиновое основание.

"Олигомерное соединение" означает соединение, содержащее один олигонуклеотид и необязательно один или несколько дополнительных компонентов, таких как конъюгированная группа или концевая группа.

"Олигонуклеотид" означает полимер из связанных нуклеозидов, каждый из которых может быть модифицированным или немодифицированным независимо друг от друга. Если не указано иное, олигонуклеотиды состоят из 8-80 связанных нуклеозидов. "Модифицированный олигонуклеотид" означает олигонуклеотид, где по меньшей мере один сахар, нуклеиновое основание или межнуклеозидная связь являются модифицированными. "Немодифицированный олигонуклеотид" означает олигонуклеотид, который не содержит какую-либо модификацию сахара, нуклеинового основания или межнуклеозидной связи.

"Исходный олигонуклеотид" означает олигонуклеотид, последовательность которого применяют в качестве основы для конструирования большего количества олигонуклеотидов со сходной последовательностью, но с различной длиной, мотивами и/или химическими структурами. Новые сконструированные олигонуклеотиды могут иметь такую же или перекрывающуюся последовательность в сравнении с исходным олигонуклеотидом.

"Парентеральное введение" означает введение путем инъекции или инфузии. Парентеральное введение включает подкожное введение, внутривенное введение, внутримышечное введение, внутриартериальное введение, внутрибрюшинное введение или внутричерепное введение, например, интратекальное или интрацеребровентрикулярное введение.

"Фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель" означает любое вещество, подходящее для применения при введении индивидууму. Например, фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой стерильный водный раствор, такой как PBS или вода для инъекций.

"Фармацевтически приемлемые соли" означают физиологически и фармацевтически приемлемые соли соединений, таких как олигомерные соединения или олигонуклеотиды, т.е. соли, которые сохраняют необходимую биологическую активность исходного соединения и не придают ему нежелательных токсикологических свойств.

"Фармацевтическое средство" означает соединение, которое оказывает терапевтически благоприятный эффект при введении индивидууму.

"Фармацевтическая композиция" означает смесь веществ, подходящих для введения индивидууму. Например, фармацевтическая композиция может содержать одно или несколько соединений или их соль и стерильный водный раствор.

"Фосфотиоатная связь" означает модифицированную фосфатную связь, в которой один из немостиковых атомов кислорода замещен атомом серы. Фосфотиоатная межнуклеозидная связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь.

"Фосфорный компонент" означает группу атомов, содержащую атом фосфора. В определенных вариантах осуществления фосфорный компонент включает в себя моно-, ди- или трифосфат или фосфотиоат.

"Фрагмент" означает определенное количество смежных (т.е. связанных) нуклеиновых оснований

нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах осуществления фрагмент представляет собой определенное количество смежных нуклеиновых оснований нуклеиновой кислоты-мишени. В определенных вариантах осуществления фрагмент представляет собой определенное количество смежных нуклеиновых оснований олигомерного соединения.

"Предупреждение" относится к задержке или предотвращению начала проявления, развития или прогрессирования заболевания, нарушения или состояния в течение периода времени от нескольких минут до неопределенного срока.

"Пролекарство" означает соединение в форме вне организма, которое при введении индивидууму метаболизируется до другой формы внутри его организма или клеток. В определенных вариантах осуществления метаболитизированная форма является активной или более активной формой соединения (например, лекарственного средства). Как правило, превращение пролекарства внутри организма облегчается благодаря действию фермента(ферментов) (например, эндогенного или вирусного фермента) или химического(химических) вещества(веществ), присутствующих в клетках или тканях, и/или физиологическим условиям.

"Снижение" означает доведение до меньших степени, размера, количества или числа.

"№ в RefSeq" представляет собой уникальную комбинацию букв и цифр, присвоенных последовательности, которые указывают на то, что последовательность соответствует конкретному транскрипту-мишени (например, гену-мишени). Такая последовательность и информация о гене-мишени (в совокупности, запись о гене) могут быть найдены в базе данных генетических последовательностей. Базы данных генетических последовательностей включают базу данных эталонных последовательностей NCBI, GenBank, Европейский архив нуклеотидов и Японский банк данных о ДНК (последние три образуют Международное сотрудничество баз данных по нуклеотидным последовательностям или INSDC).

"Область" определяется как фрагмент нуклеиновой кислоты-мишени, имеющий по меньшей мере одну идентифицируемую структуру, функцию или характеристику.

"Соединение для RNAi" означает антисмысловое соединение, которое действует, по меньшей мере частично, посредством RISC или Ago2, но не посредством РНКазы H, модулируя нуклеиновую кислоту-мишень и/или белок, кодируемый нуклеиновой кислотой-мишенью. Соединения для RNAi включают без ограничения двухнитевую siRNA, однонитевую РНК (ssRNA) и microRNA, в том числе миметики mi-siRNA.

"Сегменты" определяются как более мелкие фрагменты или субфрагменты областей в пределах нуклеиновой кислоты.

"Побочные эффекты" означают физиологическое заболевание и/или состояния, связанные с лечением, которые отличаются от желаемых эффектов. В определенных вариантах осуществления побочные эффекты включают реакции в месте инъекции, аномалии функциональных печеночных проб, аномалии функционирования почек, гепатотоксичность, почечную токсичность, аномалии функционирования центральной нервной системы, миопатии и недомогание. Например, повышенные уровни аминотрансферазы в сыворотке крови могут указывать на гепатотоксичность или аномалию функционирования печени. Например, повышенные уровни билирубина могут указывать на гепатотоксичность или аномалию функционирования печени.

"Однонитевое" применительно к соединению означает, что соединение имеет только один олигонуклеотид. "Самокомплементарный" означает олигонуклеотид, который по меньшей мере частично гибридизируется сам с собой. Соединение, состоящее из одного олигонуклеотида, где олигонуклеотид соединения является самокомплементарным, является однонитевым соединением. Однонитевое соединение может быть способно связываться с комплементарным соединением с образованием дуплекса.

"Сайты" определяются как уникальные положения нуклеиновых оснований в пределах нуклеиновой кислоты-мишени.

"Специфически гибридизирующийся" относится к олигонуклеотиду, характеризующемуся достаточной степенью комплементарности между олигонуклеотидом и нуклеиновой кислотой-мишенью для индуцирования желаемого эффекта, проявляющему в то же время минимальные эффекты или не проявляющему такие эффекты в отношении нуклеиновых кислот, не являющихся мишенями. В определенных вариантах осуществления специфическая гибридизация происходит в физиологических условиях.

"Специфическое подавление" применительно к нуклеиновой кислоте-мишени означает снижение или блокирование экспрессии нуклеиновой кислоты-мишени при проявлении в то же время меньших, минимальных эффектов или без проявления таких эффектов в отношении нуклеиновых кислот, не являющихся мишенями. Снижение не обязательно указывает на полное устранение экспрессии нуклеиновой кислоты-мишени.

"Стандартный клеточный анализ" означает анализ(анализы), описанные в примерах, и их приемлемые варианты.

"Стандартный эксперимент *in vivo*" означает процедуру(процедуры), описанные в примере(примерах), и их приемлемые варианты.

"Сахарный компонент" означает немодифицированный сахарный компонент или модифицированный сахарный компонент. "Немодифицированный сахарный компонент" или "немодифицированный са-

хар" означает 2'-ОН(Н)-фуранозильный компонент, обнаруживаемый в РНК ("немодифицированный сахарный компонент РНК"), или 2'-Н(Н)-компонент, обнаруживаемый в ДНК ("немодифицированный сахарный компонент ДНК"). Немодифицированные сахарные компоненты имеют один атом водорода в каждом из 1'-, 3'- и 4'-положений, атом кислорода в 3'-положении и два атома водорода в 5'-положении. "Модифицированный сахарный компонент" или "модифицированный сахар" означает модифицированный фуранозильный сахарный компонент или имитатор сахара. "Модифицированный фуранозильный сахарный компонент" означает фуранозильный сахар, содержащий неводородный заместитель вместо по меньшей мере одного атома водорода немодифицированного сахарного компонента. В определенных вариантах осуществления модифицированный фуранозильный сахарный компонент представляет собой 2'-замещенный сахарный компонент. Такие модифицированные фуранозильные сахарные компоненты включают в себя бициклические сахара и небциклические сахара.

"Имитатор сахара" означает модифицированный сахарный компонент, отличный от фуранозильного компонента, который может связывать нуклеиновое основание с другой группой, такой как межнуклеозидная связь, конъюгированная группа или концевая группа, в олигонуклеотиде. Модифицированные нуклеозиды, содержащие имитаторы сахаров, могут быть включены в состав олигонуклеотида в одном или нескольких положениях, и такие олигонуклеотиды способны к гибридизации с комплементарными соединениями или нуклеиновыми кислотами.

"PCSK9" означает любую нуклеиновую кислоту или белок PCSK9. "Нуклеиновая кислота PCSK9" означает любую нуклеиновую кислоту, кодирующую PCSK9. Например, в определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота PCSK9 включает в себя последовательность ДНК, кодирующую PCSK9, последовательность РНК, транскрибированную с ДНК, кодирующей PCSK9 (в том числе геномной ДНК, содержащей интроны и экзоны), и последовательность mRNA, кодирующую PCSK9. "mRNA PCSK9" означает mRNA, кодирующую белок PCSK9. Мишень может быть указана в верхнем или нижнем регистре.

"Специфический ингибитор PCSK9" относится к любому средству, способному специфически подавлять экспрессию или активность РНК PCSK9 и/или белка PCSK9 на молекулярном уровне. Например, специфические ингибиторы PCSK9 включают в себя нуклеиновые кислоты (в том числе антисмысловые соединения), пептиды, антитела, малые молекулы и другие средства, способные подавлять экспрессию РНК PCSK9 и/или белка PCSK9.

"Ген-мишень" относится к гену, кодирующему мишень.

"Нацеливание" означает специфическую гибридизацию соединения с нуклеиновой кислотой-мишенью с целью индуцирования желаемого эффекта.

Все из "нуклеиновой кислоты-мишени", "РНК-мишени", "РНК-транскрипта-мишени" и "нуклеиновой кислоты-мишени" означают нуклеиновую кислоту, на которую способны нацеливаться соединения, описанные в данном документе.

"Область-мишень" означает фрагмент нуклеиновой кислоты-мишени, на который нацеливается одно или несколько соединений.

"Сегмент-мишень" означает последовательность нуклеотидов нуклеиновой кислоты-мишени, на которую нацеливается соединение. "5'-концевой сайт-мишень" относится к самому крайнему 5'-концевому нуклеотиду сегмента-мишени. "3'-концевой сайт-мишень" относится к самому крайнему 3'-концевому нуклеотиду сегмента-мишени.

"Концевая группа" означает химическую группу или группу атомов, которая ковалентно связана с концом олигонуклеотида.

"Терапевтически эффективное количество" означает количество соединения, фармацевтического средства или композиции, которое оказывает терапевтически благоприятный эффект в отношении индивидуума.

"Лечение" относится к введению соединения или фармацевтической композиции животному с целью осуществления изменения или улучшения в отношении заболевания, нарушения или состояния у животного.

### **Определенные варианты осуществления**

В определенных вариантах осуществления предусматриваются способы, соединения и композиции для подавления экспрессии PCSK9.

В определенных вариантах осуществления предусматриваются соединения, нацеливающиеся на нуклеиновую кислоту PCSK9. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота PCSK9 имеет последовательность, приведенную под № доступа в RefSeq или GENBANK NM\_174936.3 и под № доступа в GENBANK NC\_000001.11 с отсеченными нуклеотидами 55036001-55068000 (включенную посредством ссылки, раскрытую в данном документе под SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 соответственно). В определенных вариантах осуществления соединение представляет собой антисмысловое соединение или олигомерное соединение. В определенных вариантах осуществления соединения является однонитевым. В определенных вариантах осуществления соединения является двухнитевым.

В определенных вариантах осуществления предусматривается соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов и имеющий последовательность



соединение. В определенных вариантах осуществления соединение является однонитевым. В определенных вариантах осуществления соединение является двухнитевым. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет длину 16 связанных нуклеозидов.

В определенных вариантах осуществления соединения нацеливаются на область нуклеиновой кислоты PCSK9. В определенных вариантах осуществления такие соединения, нацеливающиеся на область нуклеиновой кислоты PCSK9, имеют фрагмент из смежных нуклеиновых оснований, комплементарный фрагменту равной длины из нуклеиновых оснований данной области. Например, фрагмент может представлять собой фрагмент из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 смежных нуклеиновых оснований, комплементарный фрагменту равной длины в области, упоминаемой в данном документе. В определенных вариантах осуществления такие соединения нацеливаются на следующие нуклеотидные области под SEQ ID NO: 2: 6356-6371, 12843-12947, 12905-12948, 17681-17700, 19653-19673, 27626-27669, 27895-27949, и 28105-28136. В определенных вариантах осуществления эти соединения представляют собой бессмысловые соединения, олигомерные соединения или олигонуклеотиды.

В определенных вариантах осуществления соединения содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов и имеющий фрагмент из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 смежных нуклеиновых оснований, комплементарный фрагменту равной длины в пределах нуклеотидов 6356-6371, 12909-12924, 17685-17700, 19658-19673, 27643-27658, 27906-27921, 27916-27931, 27917-27932, и 28107-28122 в SEQ ID NO: 2.

В определенных вариантах осуществления соединения содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов и в пределах нуклеотидов 6356-6371, 12909-12924, 17685-17700, 19658-19673, 27643-27658, 27906-27921, 27916-27931, 27917-27932, и 28107-28122 являющийся комплементарным по отношению к SEQ ID NO: 2.

В определенных вариантах осуществления соединения содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов и имеющий последовательность нуклеиновых оснований, содержащую фрагмент из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 смежных нуклеиновых оснований последовательности SEQ ID NO: 1016.

В определенных вариантах осуществления соединения содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов и имеющий последовательность нуклеиновых оснований, содержащую SEQ ID NOs: 1016.

В определенных вариантах осуществления соединения содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновых оснований, состоящую из SEQ ID NO: 1016.

В определенных вариантах осуществления соединения, нацеливающиеся на PCSK9, представляют собой ISIS 863568, ISIS 863579, ISIS 863581, ISIS 863582, ISIS 863587, ISIS 863633, ISIS 863655, ISIS 863670 и ISIS 863681. Из более чем 1540 соединений, которые были подвергнуты скринингу в соответствии с описанным в разделе Примеры ниже, ISIS 863568, ISIS 863579, ISIS 863581, ISIS 863582, ISIS 863587, ISIS 863633, ISIS 863655, ISIS 863670 и ISIS 863681 оказались наилучшими лидерными соединениями. В частности, ISIS 863633 проявлял наилучшую комбинацию свойств с точки зрения эффективности и переносимости из более чем 1540 соединений.

В определенных вариантах осуществления любой из вышеперечисленных модифицированных олигонуклеотидов содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь, по меньшей мере один модифицированный сахар и/или по меньшей мере одно модифицированное нуклеиновое основание.

В определенных вариантах осуществления любой из вышеперечисленных модифицированных олигонуклеотидов содержит по меньшей мере один модифицированный сахар. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один модифицированный сахар содержит 2'-О-метоксиэтильную группу. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один модифицированный сахар представляет собой бициклический сахар, такой как содержащий группу 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2', группу 4'-CH<sub>2</sub>-O-2' или группу 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2'.

В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь, такую как фосфотиоатная межнуклеозидная связь.

В определенных вариантах осуществления любой из вышеперечисленных модифицированных олигонуклеотидов содержит по меньшей мере одно модифицированное нуклеиновое основание, такое как 5-метилцитозин.

В определенных вариантах осуществления любой из вышеперечисленных модифицированных олигонуклеотидов содержит:

гэп-сегмент, состоящий из связанных дезокси-нуклеозидов;

5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из связанных нуклеозидов; и

3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из связанных нуклеозидов;

где гэп-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, и где каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит модифицированный сахар. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет длину 16 связанных

нуклеозидов и имеет последовательность нуклеиновых оснований, содержащую последовательность SEQ ID NO: 1016.

В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеиновых оснований, который имеет последовательность нуклеиновых оснований, содержащую последовательность, упомянутую под SEQ ID NO: 1016 или состоит из него, где модифицированный олигонуклеотид содержит:

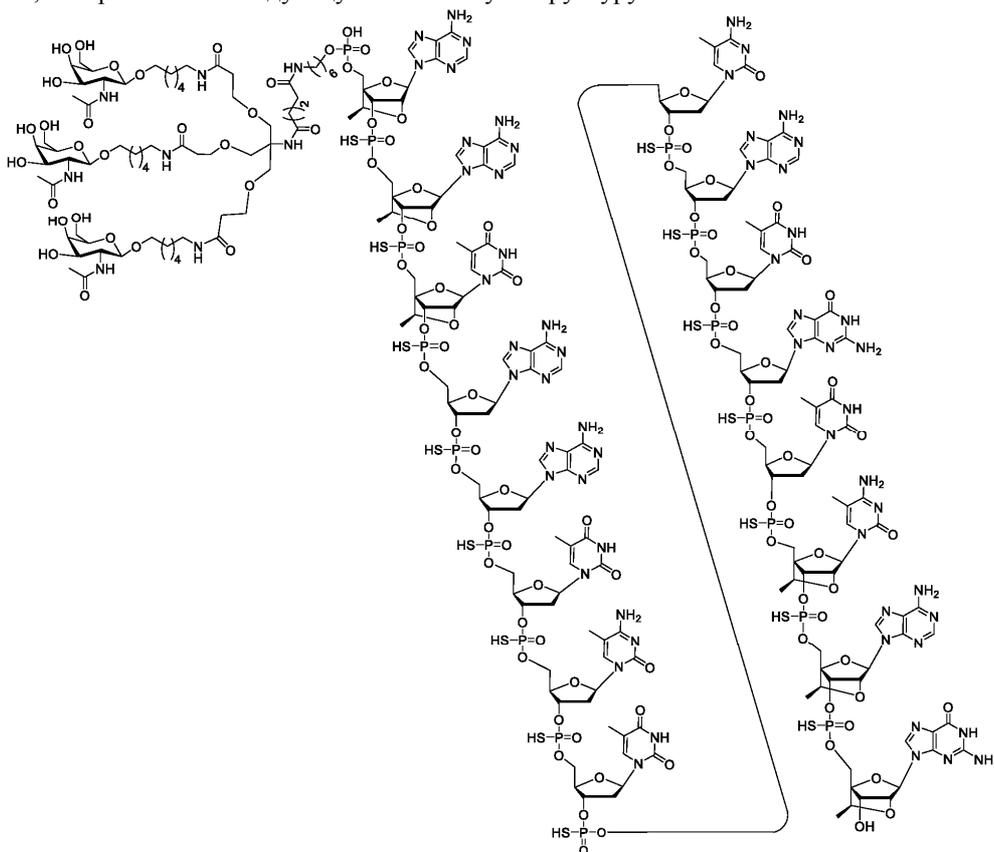
гэп-сегмент, состоящий из десяти связанных дезоксирибонуклеозидов;

5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов; и

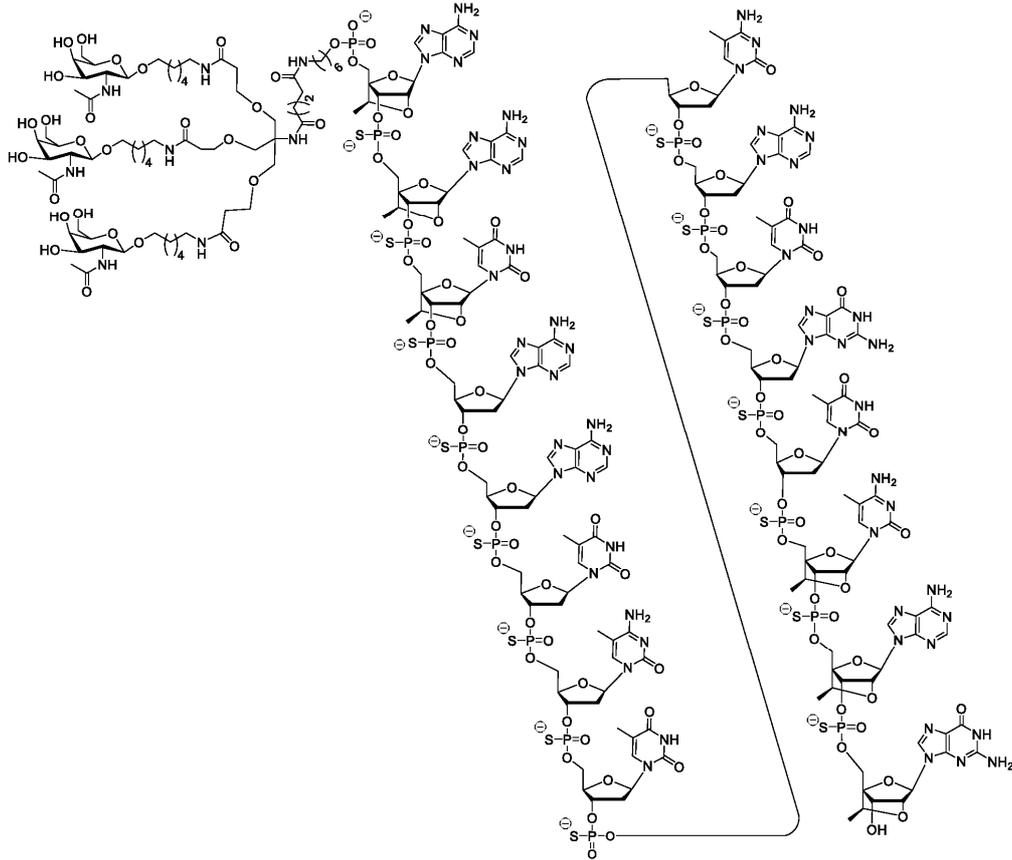
3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов;

где гэп-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, где каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит сEt-сахар; где каждая межнауклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную связь, и где каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

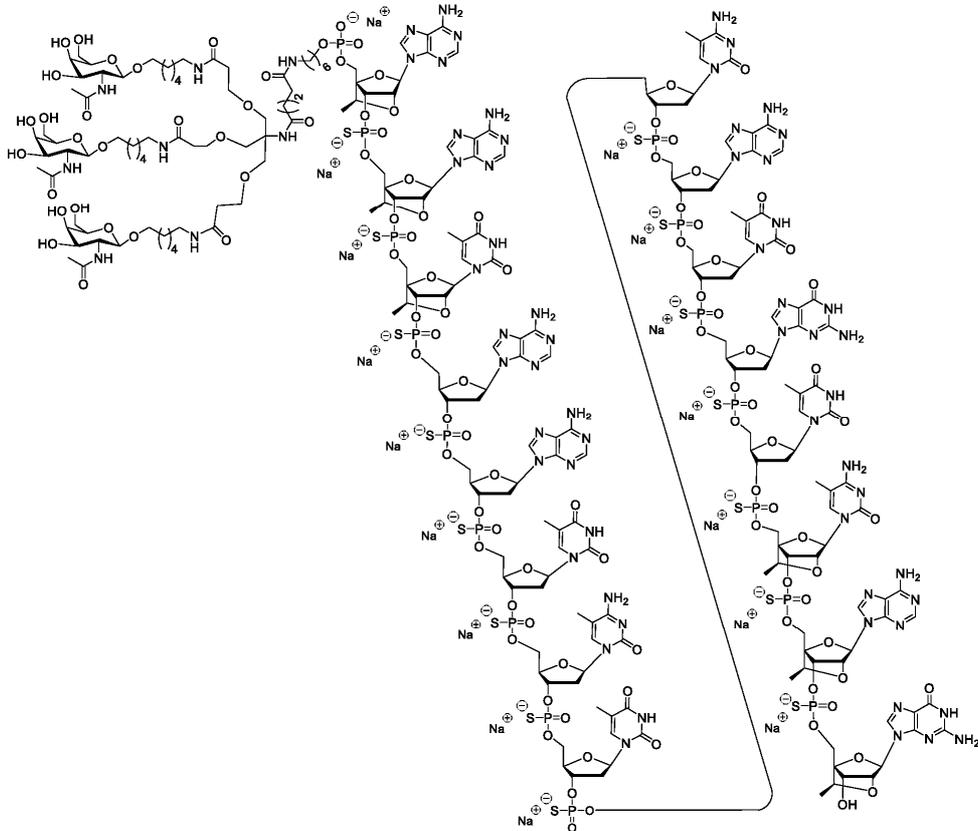
В определенных вариантах осуществления соединение содержит ISIS 863633 или его соль или состоит из них, которые имеют следующую химическую структуру:



В определенных вариантах осуществления соединение содержит ISIS 863633 или его соль или состоит из них, которые имеют следующую химическую структуру:



В определенных вариантах осуществления соединение содержит натриевую соль ISIS 863633 или состоит из нее, которая имеет следующую химическую структуру:



В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления соединения или олигонуклеотида могут быть на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% комплементарными нуклеиновой кислоте, кодирующей PCSK9.

В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления соединения может быть однонитевым.

В определенных вариантах осуществления соединение содержит дезоксирибонуклеотиды. В определенных вариантах осуществления соединения является двухнитевым. В определенных вариантах осуществления соединения является двухнитевым и содержит рибонуклеотиды. В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления соединения может представлять собой антисмысловое соединение или олигомерное соединение.

В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления соединения может иметь длину 16 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления соединения содержит олигонуклеотид или состоит из него.

В определенных вариантах осуществления соединения содержит модифицированный олигонуклеотид, описанный в данном документе, и конъюгированную группу. В определенных вариантах осуществления конъюгированная группа связана с модифицированным олигонуклеотидом на 5'-конце модифицированного олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления конъюгированная группа связана с модифицированным олигонуклеотидом на 3'-конце модифицированного олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления конъюгированная группа содержит по меньшей мере один N-ацетилгалактозамин (GalNAc), по меньшей мере два N-ацетилгалактозамина (GalNAc) или по меньшей мере три N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

В определенных вариантах осуществления соединения или композиции, предусмотренные в данном документе, содержат фармацевтически приемлемую соль модифицированного олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления соль представляет собой натриевую соль. В определенных вариантах осуществления соль представляет собой калиевую соль.

В определенных вариантах осуществления соединения или композиции, описанные в данном документе, являются активными в силу того, что они характеризуются по меньшей мере одной из IC<sub>50</sub> in vitro, составляющей менее 5 мкМ, менее 4,5 мкМ, менее 4 мкМ, менее 3,5 мкМ, менее 3 мкМ, менее 2,5 мкМ, менее 2 мкМ, менее 1,5 мкМ, менее 1 мкМ, менее 0,9 мкМ, менее 0,8 мкМ, менее 0,7 мкМ, менее 0,6 мкМ, менее 0,5 мкМ, менее 0,4 мкМ, менее 0,3 мкМ, менее 0,2 мкМ или менее 0,1 мкМ.

В определенных вариантах осуществления соединения или композиции, описанные в данном документе, хорошо переносятся, что демонстрируется наличием по меньшей мере одного из значений повышения уровня аланинтрансаминазы (ALT) или аспартаттрансаминазы (AST), составляющего не более чем в 4, в 3 или в 2 раза, по сравнению с животными, обработанными физиологическим раствором, или увеличением массы печени, селезенки или почки, составляющим не более чем 30, 20, 15, 12, 10, 5 или 2%, по сравнению с животными, обработанными контролем. В определенных вариантах осуществления соединения или композиции, описанные в данном документе, хорошо переносятся, что демонстрируется отсутствием повышения уровней ALT или AST по сравнению с животными, обработанными контролем. В определенных вариантах осуществления соединения или композиции, описанные в данном документе, хорошо переносятся, что демонстрируется отсутствием повышения массы печени, селезенки или почки по сравнению с животными, обработанными контролем.

В определенных вариантах осуществления предусматривается композиция, содержащая соединение согласно любому из вышеуказанных вариантов осуществления или любую его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один из фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя. В определенных вариантах осуществления композиция имеет вязкость, составляющую менее чем приблизительно 40 сантипуазов (сП), менее чем приблизительно 30 сП, менее чем приблизительно 20 сП, менее чем приблизительно 15 сП или менее чем приблизительно 10 сП. В определенных вариантах осуществления композиция, имеющая любое из вышеуказанных значений вязкости, содержит соединение, предусмотренное в данном документе, в концентрации приблизительно 100 мг/мл, приблизительно 125 мг/мл, приблизительно 150 мг/мл, приблизительно 175 мг/мл, приблизительно 200 мг/мл, приблизительно 225 мг/мл, приблизительно 250 мг/мл, приблизительно 275 мг/мл или приблизительно 300 мг/мл. В определенных вариантах осуществления композиция, имеющая любое из вышеуказанных значений вязкости и/или концентрации соединения, имеет температуру, соответствующую комнатной температуре или составляющую приблизительно 20°C, приблизительно 21°C, приблизительно 22°C, приблизительно 23°C, приблизительно 24°C, приблизительно 25°C, приблизительно 26°C, приблизительно 27°C, приблизительно 28°C, приблизительно 29°C или приблизительно 30°C.

#### **Некоторые показания**

Определенные варианты осуществления, предусмотренные в данном документе, относятся к способам подавления экспрессии PCSK9, которые могут быть применимыми для лечения, предупреждения или уменьшения выраженности заболевания, ассоциированного с PCSK9, у индивидуума путем введения соединения, нацеливающегося на PCSK9. В определенных вариантах осуществления соединения может представлять собой специфический ингибитор PCSK9. В определенных вариантах осуществления соединения может представлять собой антисмысловое соединение, олигомерное соединение или олигонуклеотид, нацеливающийся на PCSK9.

Примеры заболеваний, ассоциированных с PCSK9, поддающихся лечению, предупреждению и/или уменьшению интенсивности проявлений с помощью способов, предусмотренных в данном документе, включают сердечно-сосудистое заболевание, дислипидемию, смешанную дислипидемию, гиперхолесте-

ринемии, снижение уровня холестерина LDL и снижение уровня атерогенного аполипопротеина (a) [Lp(a)].

В определенных вариантах осуществления способ лечения, предупреждения или уменьшения выраженности заболевания, ассоциированного с PCSK9, у индивидуума включает введение индивидууму соединения, содержащего специфический ингибитор PCSK9, за счет чего обеспечивается лечение, предупреждение или уменьшение выраженности заболевания. В определенных вариантах осуществления индивидуум идентифицирован как имеющий заболевание, ассоциированное с PCSK9, или риск его наличия. В определенных вариантах осуществления заболевание представляет собой сердечно-сосудистое заболевание. В определенных вариантах осуществления соединение содержит антисмысловое соединение, нацеливающееся на PCSK9. В определенных вариантах осуществления соединение содержит олигонуклеотид, нацеливающийся на PCSK9. В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов и имеющий последовательность нуклеиновых оснований, содержащую по меньшей мере 8 смежных нуклеиновых оснований из последовательности нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1016. В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов и имеющий последовательность нуклеиновых оснований, содержащую последовательность нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1016. В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, состоящий из последовательности нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1016. В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов, который имеет последовательность нуклеиновых оснований, содержащую SEQ ID NO: 1016. В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновых оснований, состоящую из SEQ ID NO: 1016.

В определенных вариантах осуществления соединение представляет собой ISIS 863568, ISIS 863579, ISIS 863581, ISIS 863582, ISIS 863587, ISIS 863633, ISIS 863655, ISIS 863670 и ISIS 863681.

В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления соединения может быть одонитевым или двухнитевым. В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления соединения может представлять собой антисмысловое соединение или олигомерное соединение. В определенных вариантах осуществления соединения вводят индивидууму парентерально. В определенных вариантах осуществления в результате введения соединения снижаются уровни холестерина LDL, снижаются уровни Lp(a), индуцируется активность рецепторов LDL (LDL-R) и регулируется гомеостаз холестерина LDL посредством рецепторов LDL.

В определенных вариантах осуществления способ лечения, предупреждения или уменьшения выраженности сердечно-сосудистого заболевания включает введение индивидууму соединения, содержащего специфический ингибитор PCSK9, за счет чего обеспечивается лечение, предупреждение или уменьшение выраженности сердечно-сосудистого заболевания. В определенных вариантах осуществления заболевание представляет собой дислипидемию или гиперхолестеринемии. В определенных вариантах осуществления соединения содержит антисмысловое соединение, нацеливающееся на PCSK9. В определенных вариантах осуществления соединения содержит олигонуклеотид, нацеливающийся на PCSK9. В определенных вариантах осуществления соединения содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 8-80 связанных нуклеозидов и имеющий последовательность нуклеиновых оснований, содержащую по меньшей мере 8 смежных нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1016. В определенных вариантах осуществления соединения содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов и имеющий последовательность нуклеиновых оснований, содержащую последовательность нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1016. В определенных вариантах осуществления соединения содержит модифицированный олигонуклеотид, состоящий из последовательности нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1016. В определенных вариантах осуществления соединения содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов, который имеет последовательность нуклеиновых оснований, содержащую SEQ ID NO: 1016. В определенных вариантах осуществления соединения содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновых оснований, состоящую из SEQ ID NO: 1016. В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления модифицированный олигонуклеотид может иметь длину 16 связанных нуклеозидов.

В определенных вариантах осуществления соединения представляет собой ISIS 863568, ISIS 863579, ISIS 863581, ISIS 863582, ISIS 863587, ISIS 863633, ISIS 863655, ISIS 863670 и ISIS 863681.

В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления соединения может быть одонитевым или двухнитевым. В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления соединения может представлять собой антисмысловое соединение или олигомерное соединение. В определенных вариантах осуществления соединения вводят индивидууму парентерально. В определенных вариантах осуществления в результате введения соединения снижаются уровни холестерина LDL. В определенных вариантах осуществления в результате введения соединения снижаются уровни Lp(a). В определенных вариантах осуществления в результате введения соединения индуцируется активность рецепторов LDL (LDL-R). В

определенных вариантах осуществления в результате введения соединения регулируется гомеостаз холестерина LDL посредством рецепторов LDL.

В определенных вариантах осуществления способ подавления экспрессии PCSK9 у индивидуума, имеющего заболевание, ассоциированное с PCSK9, или риск его наличия, включает введение индивидууму соединения, содержащего специфический ингибитор PCSK9, за счет чего обеспечивается подавление экспрессии PCSK9 у индивидуума. В определенных вариантах осуществления в результате введения соединения подавляется экспрессия PCSK9 в печени. В определенных вариантах осуществления заболевание представляет собой сердечно-сосудистое заболевание. В определенных вариантах осуществления индивидуум имеет дислипидемию или характеризуется риском ее возникновения. В определенных вариантах осуществления индивидуум имеет гиперхолестеринемию или характеризуется риском ее возникновения. В определенных вариантах осуществления индивидуум имеет смешанную дислипидемию или характеризуется риском ее возникновения. В определенных вариантах осуществления соединение содержит антисмысловое соединение, нацеливающееся на PCSK9. В определенных вариантах осуществления соединение содержит олигонуклеотид, нацеливающийся на PCSK9. В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов и имеющий последовательность нуклеиновых оснований, содержащую по меньшей мере 8 смежных нуклеиновых оснований из последовательности нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1016. В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов и имеющий последовательность нуклеиновых оснований, содержащую последовательность нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1016. В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, состоящий из последовательности нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1016. В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов, который имеет последовательность нуклеиновых оснований, содержащую SEQ ID NO: 1016. В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновых оснований, состоящую из SEQ ID NO: 1016.

В определенных вариантах осуществления соединение представляет собой ISIS 863568, ISIS 863579, ISIS 863581, ISIS 863582, ISIS 863587, ISIS 863633, ISIS 863655, ISIS 863670 и ISIS 863681.

В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления соединение может быть одонитевым или двухнитевым. В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления соединение может представлять собой антисмысловое соединение или олигомерное соединение. В определенных вариантах осуществления соединение вводят индивидууму парентерально. В определенных вариантах осуществления в результате введения соединения снижаются уровни холестерина LDL. В определенных вариантах осуществления в результате введения соединения снижаются уровни Lp(a). В определенных вариантах осуществления в результате введения соединения индуцируется активность рецепторов LDL (LDL-R). В определенных вариантах осуществления в результате введения соединения регулируется гомеостаз холестерина LDL посредством рецепторов LDL.

В определенных вариантах осуществления способ подавления экспрессии PCSK9 в клетке включает приведение клетки в контакт с соединением, содержащим специфический ингибитор PCSK9, за счет чего обеспечивается подавление экспрессии PCSK9 в клетке. В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой гепатоцит. В определенных вариантах осуществления клетка находится в печени. В определенных вариантах осуществления клетка находится в печени индивидуума, который имеет сердечно-сосудистое заболевание или характеризуется риском его возникновения. В определенных вариантах осуществления клетка находится в печени индивидуума, который имеет дислипидемию или характеризуется риском ее возникновения. В определенных вариантах осуществления клетка находится в печени индивидуума, который имеет смешанную дислипидемию или характеризуется риском ее возникновения. В определенных вариантах осуществления клетка находится в печени индивидуума, который имеет гиперхолестеринемию или характеризуется риском ее возникновения. В определенных вариантах осуществления в результате введения соединения подавляется экспрессия PCSK9 в печени. В определенных вариантах осуществления индивидуум имеет сердечно-сосудистое заболевание или характеризуется риском его возникновения. В определенных вариантах осуществления индивидуум имеет дислипидемию или характеризуется риском ее возникновения. В определенных вариантах осуществления индивидуум имеет смешанную дислипидемию или характеризуется риском ее возникновения. В определенных вариантах осуществления индивидуум имеет гиперхолестеринемию или характеризуется риском ее возникновения. В определенных вариантах осуществления соединение содержит антисмысловое соединение, нацеливающееся на PCSK9. В определенных вариантах осуществления соединение содержит олигонуклеотид, нацеливающийся на PCSK9. В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов и имеющий последовательность нуклеиновых оснований, содержащую по меньшей мере 8 смежных нуклеиновых оснований из последовательности нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1016. В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов и имеющий последовательность нуклеиновых оснований, содержащую последовательность нуклеи-

новых оснований SEQ ID NO: 1016. В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, состоящий из последовательности нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1016.

В определенных вариантах осуществления соединение представляет собой ISIS 863568, ISIS 863579, ISIS 863581, ISIS 863582, ISIS 863587, ISIS 863633, ISIS 863655, ISIS 863670 и ISIS 863681.

В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления соединения может быть однонитевым или двухнитевым. В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления соединения может представлять собой антисмысловое соединение или олигомерное соединение.

В определенных вариантах осуществления способ снижения или подавления уровней холестерина LDL, снижения или подавления уровней Lp(a), индуцирования активности рецепторов LDL (LDL-R) или регуляции гомеостаза холестерина LDL посредством рецепторов LDL в печени индивидуума, имеющего заболевание, ассоциированное с PCSK9, или риск его наличия, включает введение индивидууму соединения, содержащего специфический ингибитор PCSK9, за счет чего обеспечивается снижение или подавление уровней холестерина LDL и Lp(a), индуцирование активности рецепторов LDL (LDL-R) и регуляция гомеостаза холестерина LDL посредством рецепторов LDL в печени индивидуума. В определенных вариантах осуществления индивидуум имеет сердечно-сосудистое заболевание или характеризуется риском его возникновения. В определенных вариантах осуществления индивидуум имеет дислипидемию или характеризуется риском ее возникновения. В определенных вариантах осуществления индивидуум имеет смешанную дислипидемию или характеризуется риском ее возникновения. В определенных вариантах осуществления индивидуум имеет гиперхолестеринемию или характеризуется риском ее возникновения. В определенных вариантах осуществления соединения содержит антисмысловое соединение, нацеливающееся на PCSK9. В определенных вариантах осуществления соединения содержит олигонуклеотид, нацеливающийся на PCSK9. В определенных вариантах осуществления соединения содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов и имеющий последовательность нуклеиновых оснований, содержащую по меньшей мере 8 смежных нуклеиновых оснований из последовательности нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1016. В определенных вариантах осуществления соединения содержит модифицированный олигонуклеотид, состоящий из последовательности нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1016.

В определенных вариантах осуществления соединения представляет собой ISIS 863568, ISIS 863579, ISIS 863581, ISIS 863582, ISIS 863587, ISIS 863633, ISIS 863655, ISIS 863670 и ISIS 863681.

В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления соединения может быть однонитевым или двухнитевым. В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления соединения может представлять собой антисмысловое соединение или олигомерное соединение. В определенных вариантах осуществления соединения вводят индивидууму парентерально. В определенных вариантах осуществления индивидуум идентифицирован как имеющий заболевание, ассоциированное с PCSK9, или риск его наличия.

Определенные варианты осуществления охватывают соединения, содержащее специфический ингибитор PCSK9, для применения в лечении заболевания, ассоциированного с PCSK9. В определенных вариантах осуществления заболевание представляет собой сердечно-сосудистое заболевание. В определенных вариантах осуществления заболевание представляет собой дислипидемию. В определенных вариантах осуществления заболевание представляет собой смешанную дислипидемию. В определенных вариантах осуществления заболевание представляет собой гиперхолестеринемию. В определенных вариантах осуществления соединения содержит антисмысловое соединение, нацеливающееся на PCSK9. В определенных вариантах осуществления соединения содержит олигонуклеотид, нацеливающийся на PCSK9. В определенных вариантах осуществления соединения содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов и имеющий последовательность нуклеиновых оснований, содержащую по меньшей мере 8 смежных нуклеиновых оснований из любой из последовательностей нуклеиновых оснований под SEQ ID NO: 1016. В определенных вариантах осуществления соединения содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов и имеющий последовательность нуклеиновых оснований, содержащую последовательность нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1016. В определенных вариантах осуществления соединения содержит модифицированный олигонуклеотид, состоящий из последовательности нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1016.

В определенных вариантах осуществления соединения представляет собой ISIS 863568, ISIS 863579, ISIS 863581, ISIS 863582, ISIS 863587, ISIS 863633, ISIS 863655, ISIS 863670 и ISIS 863681.

В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления соединения может быть однонитевым или двухнитевым. В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления соединения может представлять собой антисмысловое соединение или олигомерное соединение. В определенных вариантах осуществления соединения вводят индивидууму парентерально.

Определенные варианты осуществления охватывают соединения, содержащее специфический ингибитор PCSK9, для применения в снижении или подавлении уровня холестерина LDL, снижении или подавлении уровней Lp(a), индуцировании активности рецепторов LDL (LDL-R) и регуляции гомеостаза холестерина LDL посредством рецепторов LDL у индивидуума, имеющего сердечно-сосудистое заболе-



определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, состоящий из последовательности нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1016. В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов, который имеет последовательность нуклеиновых оснований, содержащую SEQ ID NO: 1016.

В определенных вариантах осуществления соединение представляет собой ISIS 863568, ISIS 863579, ISIS 863581, ISIS 863582, ISIS 863587, ISIS 863633, ISIS 863655, ISIS 863670 и ISIS 863681.

В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления соединение может быть одонитевым или двухнитевым. В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления соединение может представлять собой антисмысловое соединение или олигомерное соединение.

В любом из вышеперечисленных способов или путей применения соединение может нацеливаться на PCSK9. В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, например, модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов или состоит из него. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид является на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% комплементарным любой из последовательностей нуклеиновых оснований, упомянутых под SEQ ID NO: 1, 2, 1545-1550. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь, по меньшей мере один модифицированный сахар и/или по меньшей мере одно модифицированное нуклеиновое основание. В определенных вариантах осуществления модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь, модифицированный сахар представляет собой бициклический сахар или 2'-О-метоксиэтил-модифицированный сахар, а модифицированное нуклеиновое основание представляет собой 5-метилцитозин. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит гэта-сегмент, состоящий из связанных дезоксинуклеозидов; 5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из связанных нуклеозидов; и 3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из связанных нуклеозидов, где гэта-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, непосредственно примыкая к ним, и где каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит модифицированный сахар.

В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет длину 16 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид является на по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 100% комплементарным любой из последовательностей нуклеиновых оснований, упомянутых под SEQ ID NO: 1, 2, 1545-1550. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь, по меньшей мере один модифицированный сахар и/или по меньшей мере одно модифицированное нуклеиновое основание. В определенных вариантах осуществления модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь, модифицированный сахар представляет собой бициклический сахар или 2'-О-метоксиэтил-модифицированный сахар, а модифицированное нуклеиновое основание представляет собой 5-метилцитозин. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит гэта-сегмент, состоящий из связанных 2'-дезоксинуклеозидов; 5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из связанных нуклеозидов; и 3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из связанных нуклеозидов, где гэта-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, непосредственно примыкая к ним, и где каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит модифицированный сахар.

В любом из вышеперечисленных способов или путей применения соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов и имеющий последовательность нуклеиновых оснований, содержащую SEQ ID NO: 1016, или состоит из него, где модифицированный олигонуклеотид содержит:

гэта-сегмент, состоящий из связанных 2'-дезоксинуклеозидов; 5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из связанных нуклеозидов; и 3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из связанных нуклеозидов;

где гэта-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, и где каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит модифицированный сахар.

В любом из вышеперечисленных способов или путей применения соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеиновых оснований, или состоит из него, который имеет последовательность нуклеиновых оснований, содержащую последовательность SEQ ID NO: 1016, или состоящую из нее, где модифицированный олигонуклеотид содержит:

гэта-сегмент, состоящий из десяти связанных дезоксинуклеозидов;

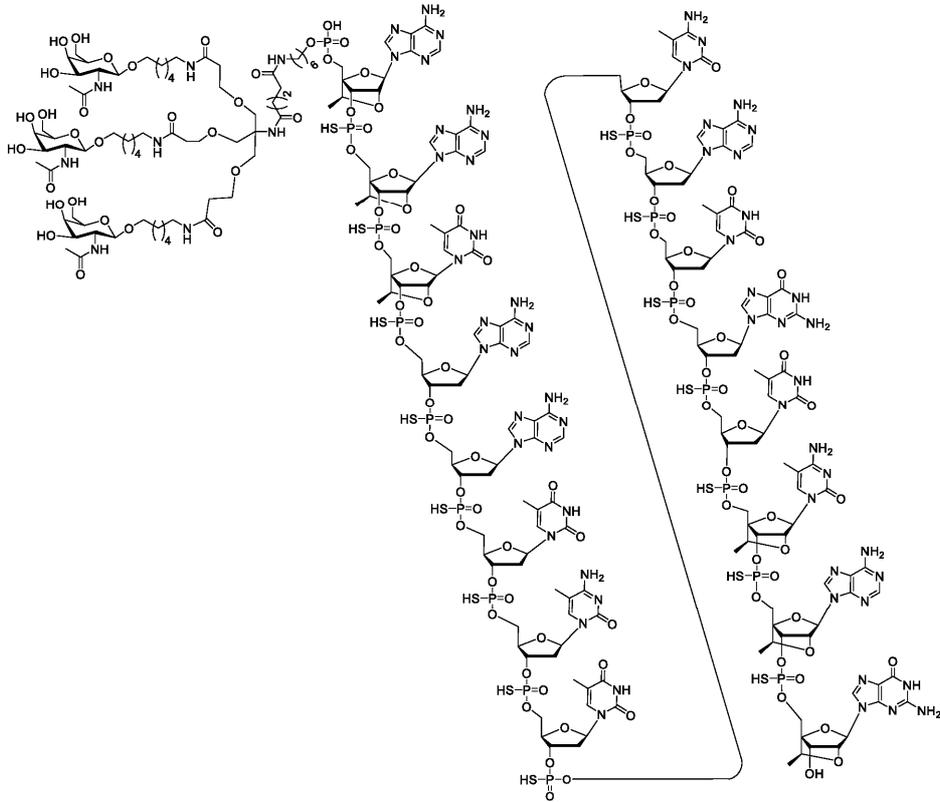
5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов; и

3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов;

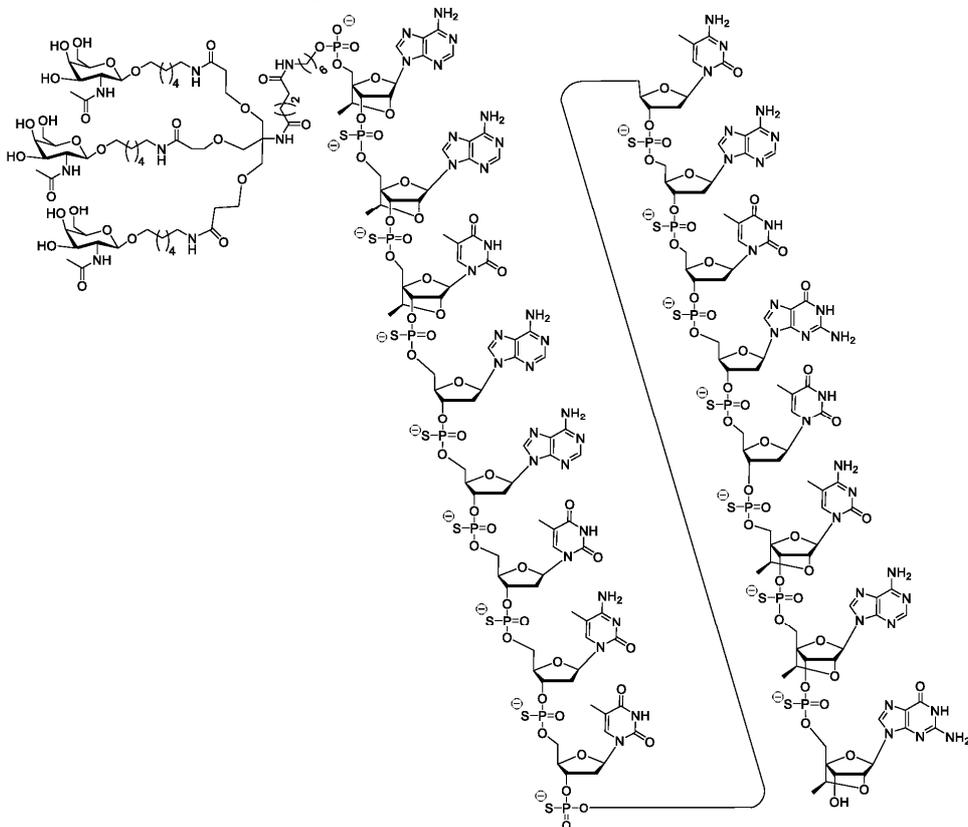
где гэта-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, где каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит сЕт-сахар; где каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную связь; где каждый цитозин представляет собой 5-

метилцитозин. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет длину 16 связанных нуклеозидов.

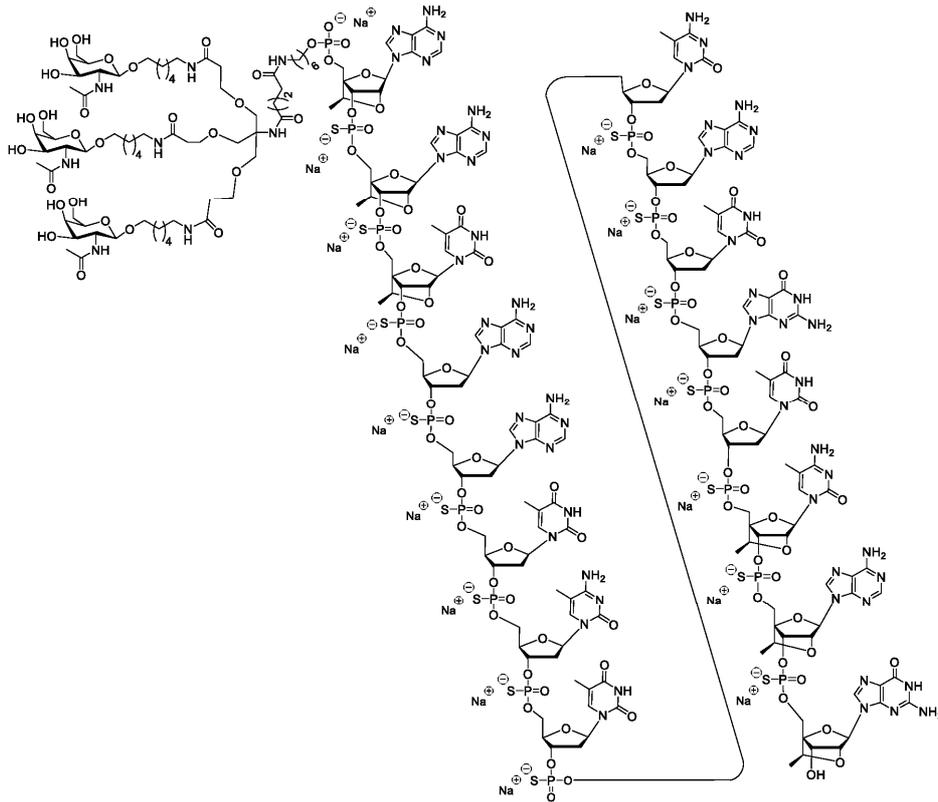
В любом из вышеперечисленных способов или путей применения соединение содержит ISIS 863633 или его соль или состоит из них, которые имеют следующую химическую структуру:



В любом из вышеперечисленных способов или путей применения соединение содержит ISIS 863633 или его соль или состоит из них, которые имеют следующую химическую структуру:



В любом из вышеперечисленных способов или путей применения соединение содержит натриевую соль ISIS 863633 или состоит из нее, которая имеет следующую химическую структуру:



В любом из вышеперечисленных способов или путей применения соединения можно вводить парентерально. Например, в определенных вариантах осуществления соединения можно вводить посредством инъекции или инфузии. Парентеральное введение включает подкожное введение, внутривенное введение, внутримышечное введение, внутриартериальное введение, внутрибрюшинное введение или внутричерепное введение, например, интратекальное или интрацеребровентрикулярное введение.

#### Некоторые соединения

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, могут представлять собой антисмысловые соединения. В определенных вариантах осуществления антисмысловое соединение содержит олигомерное соединение или состоит из него. В определенных вариантах осуществления олигомерное соединение содержит модифицированный олигонуклеотид. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты-мишени.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит модифицированный олигонуклеотид или состоит из него. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты-мишени.

В определенных вариантах осуществления соединения или антисмысловое соединение является одонитевым. Такое одонитевое соединение или антисмысловое соединение содержит олигомерное соединение или состоит из него. В определенных вариантах осуществления такое олигомерное соединение содержит олигонуклеотид и необязательно конъюгированную группу или состоит из них. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид представляет собой антисмысловый олигонуклеотид. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид является модифицированным. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид одонитевого антисмыслового соединения или олигомерного соединения содержит самокомплементарную последовательность нуклеиновых оснований.

В определенных вариантах осуществления соединения являются двухнитевыми. Такие двухнитевые соединения содержат первый модифицированный олигонуклеотид, имеющий область, комплементарную нуклеиновой кислоте-мишени, и второй модифицированный олигонуклеотид, имеющий область, комплементарную первому модифицированному олигонуклеотиду. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид представляет собой РНК-олигонуклеотид. В таких вариантах осуществления тиминное нуклеиновое основание в модифицированном олигонуклеотиде замещено урациловым нуклеиновым основанием. В определенных вариантах осуществления соединения содержит конъюгированную группу. В определенных вариантах осуществления один из модифицированных олигонуклеотидов является конъюгированным. В определенных вариантах осуществления оба модифицированных олигонуклеотида являются конъюгированными. В определенных вариантах осуществления первый модифицированный олигонуклеотид является конъюгированным. В определенных вариантах осуществ-

ствления второй модифицированный олигонуклеотид является конъюгированным. В определенных вариантах осуществления первый модифицированный олигонуклеотид имеет длину 12-30 связанных нуклеозидов, и второй модифицированный олигонуклеотид имеет длину 12-30 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления один из модифицированных олигонуклеотидов имеет последовательность нуклеиновых оснований, содержащую по меньшей мере 8 смежных нуклеиновых оснований из SEQ ID NO: 1016.

В определенных вариантах осуществления антисмысловые соединения являются двухнитевыми. Такие двухнитевые антисмысловые соединения содержат первое олигомерное соединение, имеющее область, комплементарную нуклеиновой кислоте-мишени, и второе олигомерное соединение, имеющее область, комплементарную первому олигомерному соединению. Первое олигомерное соединение таких двухнитевых антисмысловых соединений, как правило, содержит модифицированный олигонуклеотид и необязательно конъюгированную группу или состоит из них. Олигонуклеотид второго олигомерного соединения такого двухнитевого антисмыслового соединения может быть модифицированным или немодифицированным. Любое из олигомерных соединений двухнитевого антисмыслового соединения или оба из них могут содержать конъюгированную группу. Олигомерные соединения двухнитевых антисмысловых соединений могут содержать некомплементарные нуклеозиды выступающих концов.

Примеры однонитевых и двухнитевых соединений включают без ограничения олигонуклеотиды, siRNA, олигонуклеотиды, нацеливающиеся на microRNA, и однонитевые соединения для RNAi, такие как малые шпилечные РНК (shRNA), однонитевые siRNA (ssRNA) и миметики microRNA.

В определенных вариантах осуществления соединение, описанное в данном документе, имеет последовательность нуклеиновых оснований, которая, будучи записанной в направлении 5'-3', содержит последовательность, обратную комплементарную сегменту-мишени нуклеиновой кислоты-мишени, на которую оно нацеливается.

В определенных вариантах осуществления соединение, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 10-30 связанных субъединиц. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 12-30 связанных субъединиц. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 12-22 связанных субъединицы. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 14-30 связанных субъединиц. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 14-20 связанных субъединиц. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 15-30 связанных субъединиц. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 15-20 связанных субъединиц. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 16-30 связанных субъединиц. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 16-20 связанных субъединиц. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 17-30 связанных субъединиц. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 17-20 связанных субъединиц. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 18-30 связанных субъединиц. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 18-21 связанную субъединицу. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 18-20 связанных субъединиц. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 20-30 связанных субъединиц. Другими словами, такие олигонуклеотиды имеют длину 12-30 связанных субъединиц, 14-30 связанных субъединиц, 14-20 субъединиц, 15-30 субъединиц, 15-20 субъединиц, 16-30 субъединиц, 16-20 субъединиц, 17-30 субъединиц, 17-20 субъединиц, 18-30 субъединиц, 18-20 субъединиц, 18-21 субъединица, 20-30 субъединиц или 12-22 связанные субъединицы соответственно. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 14 связанных субъединиц. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных субъединиц. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 17 связанных субъединиц. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 18 связанных субъединиц. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 19 связанных субъединиц. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 20 связанных субъединиц. В других вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид из 8-80, 12-50, 13-30, 13-50, 14-30, 14-50, 15-30, 15-50, 16-30, 16-50, 17-30, 17-50, 18-22, 18-24, 18-30, 18-50, 19-22, 19-30, 19-50 или 20-30 свя-

занных субъединиц. В определенных таких вариантах осуществления соединение, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид, имеющий длину 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 связанных субъединиц или длину в диапазоне, ограниченном любыми двумя из вышеприведенных значений. В определенных вариантах осуществления связанные субъединицы представляют собой нуклеотиды, нуклеозиды или нуклеиновые основания.

В определенных вариантах осуществления соединение может дополнительно содержать дополнительные компоненты или элементы, такие как конъюгированная группа, которые присоединены к олигонуклеотиду. В определенных вариантах осуществления такие соединения представляют собой антисмысловые соединения. В определенных вариантах осуществления такие соединения представляют собой олигомерные соединения. В вариантах осуществления, в которых конъюгированная группа содержит нуклеозид (т.е. нуклеозид, который связывает конъюгированную группу с олигонуклеотидом), нуклеозид конъюгированной группы не учитывается в длине олигонуклеотида.

В определенных вариантах осуществления соединения могут быть укороченными или усеченными. Например, одна субъединица может быть удалена с 5'-конца (5'-концевое усечение) или, в качестве альтернативы, с 3'-конца (3'-концевое усечение). У укороченного или усеченного соединения, нацеливающегося на нуклеиновую кислоту PCSK9, могут быть удалены две субъединицы с 5'-конца или, в качестве альтернативы, могут быть удалены две субъединицы с 3'-конца соединения. В качестве альтернативы, удаленные нуклеозиды могут быть распределены по всему соединению.

При наличии в удлиненном соединении одной дополнительной субъединицы дополнительная субъединица может быть расположена на 5'- или 3'-конце соединения. При наличии двух или более дополнительных субъединиц добавленные субъединицы могут примыкать друг к другу, например, в соединении, имеющем две субъединицы, добавленные на 5'-конце (5'-концевое добавление) или, в качестве альтернативы, на 3'-конце (3'-концевое добавление) соединения. В качестве альтернативы, добавленные субъединицы могут быть распределены по всему соединению.

Можно увеличить или уменьшить длину соединения, такого как олигонуклеотид, и/или ввести несовпадающие основания без устранения активности (Woolf et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992, 89:7305-7309; Gautschi et al. J. Natl. Cancer Inst. March 2001, 93:463-471; Maher and Dolnick Nuc. Acid. Res. 1998, 16:3341-3358). Однако, казалось бы, небольшие изменения в последовательности, химических структурах и мотивах олигонуклеотида могут сильно повлиять на одно или несколько из множества свойств, необходимых для клинического исследования (Seth et al. J. Med. Chem. 2009, 52, 10; Egli et al. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 16642).

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, представляют собой соединения на основе интерферирующей РНК (для RNAi), которые включают в себя соединения на основе двухнитевой РНК (также называемые короткими интерферирующими РНК или siRNA) и соединения на основе однонитевой RNAi (или ssRNA). Такие соединения осуществляют свою функцию по меньшей мере частично посредством сигнального пути RISC с разрушением и/или секвестрацией нуклеиновой кислоты-мишени (следовательно, включают в себя соединения на основе microRNA/миметиков microRNA). Подразумевается, что используемый в данном документе термин "siRNA" эквивалентен другим терминам, используемым для описания молекул нуклеиновой кислоты, которые способны опосредовать RNAi, специфическую в отношении последовательности, например, короткой интерферирующей РНК (siRNA), двухнитевой РНК (dsRNA), microRNA (miRNA), короткой шпилечной РНК (shRNA), короткому интерферирующему олигонуклеотиду, короткой интерферирующей нуклеиновой кислоте, короткому интерферирующему модифицированному олигонуклеотиду, химически модифицированной siRNA, РНК для посттранскрипционного сайленсинга генов (ptgsRNA) и другим. Кроме того, подразумевается, что используемый в данном документе термин "RNAi" эквивалентен другим терминам, используемым для описания РНК-интерференции, специфической в отношении последовательности, таким как посттранскрипционный сайленсинг генов, подавление трансляции или эпигенетические механизмы.

В определенных вариантах осуществления соединение, описанное в данном документе, может содержать любую из описанных в данном документе олигонуклеотидных последовательностей, нацеливающих на PCSK9. В определенных вариантах осуществления соединение может быть двухнитевым. В определенных вариантах осуществления соединение содержит первую нить, содержащую фрагмент из 16 смежных нуклеиновых оснований из SEQ ID NO: 1016, и вторую нить. В определенных вариантах осуществления соединение содержит первую нить, содержащую последовательность нуклеиновых оснований под любым из SEQ ID NO: 3-1540, и вторую нить. В определенных вариантах осуществления соединение содержит рибонуклеотиды, при этом первая нить содержит урацил (U) вместо тимина (T) в любой из SEQ ID NO: 3-1540. В определенных вариантах осуществления соединение содержит (i) первую нить, содержащую последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную сайту и PCSK9, на который нацеливается любая из SEQ ID NO: 3-1540, и (ii) вторую нить. В определенных вариантах осуществления соединение содержит один или несколько модифицированных нуклеотидов, у которых в 2'-

положении в сахаре содержится галоген (такой как группа фтора; 2'-F) или содержится алкоксигруппа (такая как метоксигруппа; 2'-OMe). В определенных вариантах осуществления соединение содержит по меньшей мере одну 2'-F-модификацию сахара и по меньшей мере одну 2'-OMe-модификацию сахара. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна 2'-F-модификация сахара и по меньшей мере одна 2'-OMe-модификация сахара расположены в чередующемся порядке на протяжении по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеиновых оснований вдоль нити соединения на основе dsRNA. В определенных вариантах осуществления соединение содержит между прилегающими нуклеотидами одну или несколько связей, отличных от встречающейся в природе фосфодиэфирной связи. Примеры таких связей включают фосфорамидные, фосфотиоатные и фосфодитиоатные связи. Соединения также могут представлять собой химически модифицированные молекулы нуклеиновых кислот, как раскрыто в патенте США № 6673661. В других вариантах осуществления соединения содержит одну или две кэпированные нити, как раскрыто, например, в WO 00/63364, поданной 19 апреля 2000 г.

В определенных вариантах осуществления первая нить соединения представляет собой направляющую нить siRNA, а вторая нить соединения представляет собой сопровождающую нить siRNA. В определенных вариантах осуществления вторая нить соединения комплементарна первой нити. В определенных вариантах осуществления каждая нить соединения имеет длину 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления первая или вторая нить соединения может содержать конъюгированную группу.

В определенных вариантах осуществления соединение, описанное в данном документе, может содержать любую из описанных в данном документе олигонуклеотидных последовательностей, нацеливаемых на PCSK9. В определенных вариантах осуществления соединение является однонитевым. В определенных вариантах осуществления такое соединение представляет собой однонитевое соединение для RNAi (ssRNAi). В определенных вариантах осуществления соединение содержит фрагмент из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеиновых оснований из любой из SEQ ID NO: 3-1540. В определенных вариантах осуществления соединения содержит последовательность нуклеиновых оснований под любым из SEQ ID NO: 3-1540. В определенных вариантах осуществления соединения содержит рибонуклеотиды, при этом урацил (U) располагается на месте тимина (T) в любой из SEQ ID NO: 3-1540. В определенных вариантах осуществления соединения содержит последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную сайту в PCSK9, на который нацеливается любая из SEQ ID NO: 3-1540. В определенных вариантах осуществления соединения содержит один или несколько модифицированных нуклеотидов, у которых в 2'-положении в сахаре содержится галоген (такой как группа фтора; 2'-F) или содержится алкоксигруппа (такая как метоксигруппа; 2'-OMe). В определенных вариантах осуществления соединения содержит по меньшей мере одну 2'-F-модификацию сахара и по меньшей мере одну 2'-OMe-модификацию сахара. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна 2'-F-модификация сахара и по меньшей мере одна 2'-OMe-модификация сахара расположены в чередующемся порядке на протяжении по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеиновых оснований вдоль нити соединения. В определенных вариантах осуществления соединения содержит между прилегающими нуклеотидами одну или несколько связей, отличных от встречающейся в природе фосфодиэфирной связи. Примеры таких связей включают фосфорамидные, фосфотиоатные и фосфодитиоатные связи. Соединения также могут представлять собой химически модифицированные молекулы нуклеиновых кислот, как раскрыто в патенте США № 6673661. В других вариантах осуществления соединения содержит кэпированную нить, как раскрыто, например, в WO 00/63364, поданной 19 апреля 2000 г. В определенных вариантах осуществления соединения состоит из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления соединения может содержать конъюгированную группу.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат модифицированные олигонуклеотиды. Определенные модифицированные олигонуклеотиды имеют один или несколько центров асимметрии и поэтому образуют энантиомеры, диастереомеры и другие стереоизомерные конфигурации, которые можно определять с точки зрения абсолютной стереохимии как (R) или (S), как  $\alpha$  или  $\beta$ , как, например, в случае с аномерами сахаров, или как (D) или (L), как, например, в случае с аминокислотами и т. д. В модифицированные олигонуклеотиды, предусмотренные в данном документе, включены все такие возможные изомеры, в том числе их рацемические и оптически чистые формы, если не указано иное. Аналогичным образом, также включены все цис- и транс-изомеры и таутомерные формы.

Соединения, описанные в данном документе, включают в себя варианты, в которых один или несколько атомов заменены нерадиоактивным изотопом или радиоактивным изотопом указанного элемента. Например, соединения согласно данному документу, которые содержат атомы водорода, охватывают все возможные замещения дейтерием каждого из атомов водорода  $^1\text{H}$ . Изотопные замещения, охватываемые соединениями согласно данному документу, включают без ограничения:  $^2\text{H}$  или  $^3\text{H}$  вместо  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  или  $^{14}\text{C}$  вместо  $^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  вместо  $^{14}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$  или  $^{18}\text{O}$  вместо  $^{16}\text{O}$ , а также  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{35}\text{S}$  или  $^{36}\text{S}$  вместо  $^{32}\text{S}$ . В опре-

деленных вариантах осуществления замещения нерадиоактивными изотопами могут придавать соединению новые свойства, которые являются благоприятными для его применения в качестве инструмента терапии или исследований. В определенных вариантах осуществления замещения радиоактивными изотопами могут делать соединение подходящим для исследовательских или диагностических целей, таких как визуализационный анализ.

#### **Некоторые механизмы**

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат модифицированные олигонуклеотиды или состоят из них. В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, представляют собой антисмысловые соединения. В определенных вариантах осуществления соединения содержат олигомерные соединения. В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, способны гибридизоваться с нуклеиновой кислотой-мишенью, что приводит к по меньшей мере одной форме антисмысловой активности. В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, избирательно воздействуют на одну или несколько нуклеиновых кислот-мишеней. Такие соединения содержат последовательность нуклеиновых оснований, которая гибридизуется с одной или несколькими нуклеиновыми кислотами-мишенями, что приводит к одной или нескольким формам желаемой антисмысловой активности, и не гибридизуется с одной или несколькими нуклеиновыми кислотами, не являющимися мишенями, или не гибридизуется с одной или несколькими нуклеиновыми кислотами, не являющимися мишенями, таким образом, что это приводит к значительной нежелательной антисмысловой активности.

При определенных формах антисмысловой активности гибридизация соединения, описанного в данном документе, с нуклеиновой кислотой-мишенью приводит к привлечению белка, который расщепляет нуклеиновую кислоту-мишень. Например, определенные соединения, описанные в данном документе, приводят к опосредованному РНКазой Н расщеплению нуклеиновой кислоты-мишени. РНКазы Н представляет собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет нить РНК в дуплексе РНК:ДНК. ДНК в таком дуплексе РНК:ДНК не обязательно должна быть немодифицированной ДНК. В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, являются достаточно "ДНК-подобными", чтобы вызывать активность РНКазы Н. Кроме того, в определенных вариантах осуществления допускаются один или несколько нуклеозидов, не являющихся ДНК-подобными, в гЭп-сегменте гЭпмера.

При определенных формах антисмысловой активности соединения, описанные в данном документе, или фрагмент соединения включается в состав РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC), что в конечном счете приводит к расщеплению нуклеиновой кислоты-мишени. Например, определенные соединения, описанные в данном документе, приводят к расщеплению нуклеиновой кислоты-мишени с помощью белка Argonaute. Соединения, которые включаются в состав RISC, являются соединениями для RNAi. Соединения для RNAi могут быть двухнитевыми (siRNA) или однонитевыми (ssRNA).

В определенных вариантах осуществления гибридизация соединений, описанных в данном документе, с нуклеиновой кислотой-мишенью не приводит к привлечению белка, который расщепляет нуклеиновую кислоту-мишень. В определенных подобных вариантах осуществления гибридизация соединения с нуклеиновой кислотой-мишенью приводит к изменению сплайсинга нуклеиновой кислоты-мишени. В определенных вариантах осуществления гибридизация соединения с нуклеиновой кислотой-мишенью приводит к подавлению связывающего взаимодействия между нуклеиновой кислотой-мишенью и белком или другой нуклеиновой кислотой. В определенных подобных вариантах осуществления гибридизация соединения с нуклеиновой кислотой-мишенью приводит к изменению трансляции нуклеиновой кислоты-мишени.

Формы антисмысловой активности можно наблюдать непосредственно или опосредованно. В определенных вариантах осуществления наблюдение или выявление антисмысловой активности предусматривает наблюдение или выявление изменения количества нуклеиновой кислоты-мишени или белка, кодируемого такой нуклеиновой кислотой-мишенью, изменения соотношения сплайс-вариантов нуклеиновой кислоты или белка и/или фенотипического изменения в клетке или у животного.

#### **Нуклеиновые кислоты-мишени, области-мишени и нуклеотидные последовательности**

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат олигонуклеотид, содержащий область, комплементарную нуклеиновой кислоте-мишени, или состоят из него. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота-мишень представляет собой молекулу эндогенной РНК. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота-мишень кодирует белок. В определенных подобных вариантах осуществления нуклеиновая кислота-мишень выбрана из mRNA и пре-mRNA, содержащей интронные, экзонные и нетранслируемые области. В определенных вариантах осуществления РНК-мишень представляет собой mRNA. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота-мишень представляет собой пре-mRNA. В определенных подобных вариантах осуществления область-мишень полностью находится в пределах интрона. В определенных вариантах осуществления область-мишень охватывает экзон-интронное сочленение. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 50% области-мишени находится в пределах интрона.

Нуклеотидные последовательности, которые кодируют PCSK9, включают без ограничения следующие: № в RefSeq и № доступа в GENBANK NM\_174936.3 (SEQ ID NO: 1), № доступа в GENBANK NC\_000001.11 с отсеченными нуклеотидами 55036001-55068000 (SEQ ID NO: 2), № доступа в GENBANK AK124635.1 (SEQ ID NO: 1545), № доступа в GENBANK NT\_032977.8 с отсеченными нуклеотидами 25475000-25504000 (SEQ ID NO: 1546), № доступа в GENBANK DA092236.1 (SEQ ID NO: 1547), № доступа в GENBANK DA803830.1 (SEQ ID NO: 1548), № доступа в GENBANK DC352135.1 (SEQ ID NO: 1549) и № доступа в GENBANK NR\_110451.1 (SEQ ID NO: 1550).

#### **Гибридизация**

В некоторых вариантах осуществления между соединением, раскрытым в данном документе, и нуклеиновой кислотой PCSK9 происходит гибридизация. Наиболее распространенный механизм гибридизации предполагает образование водородных связей (например, образование водородных связей по типу уотсон-криковского, хугстиновского или обратного хугстиновского взаимодействия) между комплементарными нуклеиновыми основаниями молекул нуклеиновой кислоты.

Гибридизация может происходить в различных условиях. Условия гибридизации зависят от последовательности и определяются природой и составом молекул нуклеиновой кислоты, подлежащих гибридизации.

Способы определения того, может ли последовательность специфически гибридизоваться с нуклеиновой кислотой-мишенью, хорошо известны из уровня техники. В определенных вариантах осуществления соединения, предусмотренные в данном документе, могут специфически гибридизоваться с нуклеиновой кислотой PCSK9.

#### **Комплементарность**

Говорят, что олигонуклеотид является комплементарным другой нуклеиновой кислоте, если последовательность нуклеиновых оснований такого олигонуклеотида или одной или нескольких его областей соответствует последовательности нуклеиновых оснований другого олигонуклеотида или нуклеиновой кислоты или одной или нескольких их областей при выравнивании двух последовательностей нуклеиновых оснований в противоположных направлениях. Описанные в данном документе совпадения нуклеиновых оснований или комплементарные нуклеиновые основания ограничены следующими парами: аденин (A) и тимин (T), аденин (A) и урацил (U), цитозин (C) и гуанин (G) и 5-метилицитозин (mC) и гуанин (G), если не указано иное. Комплементарные олигонуклеотиды и/или нуклеиновые кислоты не должны характеризоваться комплементарностью нуклеиновых оснований по каждому нуклеозиду и могут содержать одно или несколько несовпадений нуклеиновых оснований. Олигонуклеотид является полностью комплементарным или на 100% комплементарным, если такие олигонуклеотиды характеризуются совпадениями нуклеиновых оснований по каждому нуклеозиду без каких-либо несовпадений нуклеиновых оснований.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат модифицированные олигонуклеотиды или состоят из них. В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, представляют собой бессмысловые соединения. В определенных вариантах осуществления соединения содержат олигомерные соединения. Некомплементарные нуклеиновые основания между соединением и нуклеиновой кислотой PCSK9 могут допускаться при условии, что соединение сохраняет способность специфически гибридизоваться с нуклеиновой кислотой-мишенью. Более того, соединение может гибридизоваться с одним или несколькими сегментами нуклеиновой кислоты PCSK9 таким образом, что промежуточные или примыкающие сегменты не участвуют в событии гибридизации (например, с образованием петлевой структуры, несовпадения или шпильчатой структуры).

В определенных вариантах осуществления соединения, предусмотренные в данном документе, или их определенный фрагмент являются комплементарными нуклеиновой кислоте PCSK9, ее области-мишени, сегменту-мишени или определенному фрагменту на величину, составляющую, составляющую по меньшей мере или составляющую до 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%. В определенных вариантах осуществления соединения, предусмотренные в данном документе, или их определенный фрагмент являются комплементарными нуклеиновой кислоте PCSK9, ее области-мишени, сегменту-мишени или определенному фрагменту на 70-75, 75-80, 80-85, 85-90, 90-95, 95-100% или любую величину в пределах этих диапазонов. Процент комплементарности соединения по отношению к нуклеиновой кислоте-мишени можно определить с помощью стандартных способов.

Например, соединение, в котором 18 из 20 нуклеиновых оснований соединения являются комплементарными области-мишени и, следовательно, будут специфически гибридизоваться, будет комплементарным на 90 процентов. В этом примере остальные некомплементарные нуклеиновые основания могут образовывать кластеры или чередоваться с комплементарными нуклеиновыми основаниями и не должны быть смежными друг с другом или с комплементарными нуклеиновыми основаниями. Соответственно, соединение, длина которого составляет 18 нуклеиновых оснований, имеющее четыре некомплементарных нуклеиновых основания, которые фланкированы двумя областями, полностью комплементарными нуклеиновой кислоте-мишени, будет характеризоваться общей комплементарностью с нуклеиновой кислотой-мишенью, составляющей 77,8%. Процент комплементарности соединения с областью

нуклеиновой кислоты-мишени можно определить обычным образом с помощью программ BLAST (средства поиска основного локального выравнивания) и программ PowerBLAST, известных из уровня техники (Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, *Genome Res.*, 1997, 7, 649-656). Процент гомологии, идентичности или комплементарности последовательностей можно определить, например, с помощью программы Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, версия 8 для Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Мэдисон, Висконсин), используя настройки по умолчанию, в которой используется алгоритм Смита-Уотермана (*Adv. Appl. Math.*, 1981, 2, 482-489).

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, или их определенные фрагменты являются полностью комплементарными (т.е. на 100% комплементарными) нуклеиновой кислоте-мишени или ее определенному фрагменту. Например, соединение может быть полностью комплементарным нуклеиновой кислоте PCSK9 или ее области-мишени, или сегменту-мишени, или последовательности-мишени. Как используется в данном документе, "полностью комплементарное" означает, что каждое нуклеиновое основание соединения является комплементарным соответствующему нуклеиновому основанию нуклеиновой кислоты-мишени. Например, соединение из 20 нуклеиновых оснований является полностью комплементарным нуклеиновой кислоте-мишени длиной 400 нуклеиновых оснований, при условии, что в нуклеиновой кислоте-мишени имеется соответствующий фрагмент из 20 нуклеиновых оснований, который является полностью комплементарным соединению. "Полностью комплементарный" также можно использовать применительно к определенному фрагменту первой и/или второй нуклеиновой кислоты. Например, фрагмент из 20 нуклеиновых оснований в соединении из 30 нуклеиновых оснований может быть "полностью комплементарным" нуклеиновой кислоте-мишени длиной 400 нуклеиновых оснований. Фрагмент из 20 нуклеиновых оснований в соединении из 30 нуклеиновых оснований является полностью комплементарным последовательности-мишени, если в последовательности-мишени имеется соответствующий фрагмент из 20 нуклеиновых оснований, в котором каждое нуклеиновое основание является комплементарным нуклеиновому основанию во фрагменте из 20 нуклеиновых оснований в соединении. В то же самое время все соединение из 30 нуклеиновых оснований может быть или может не быть полностью комплементарным последовательности-мишени в зависимости от того, являются ли остальные 10 нуклеиновых оснований в соединении также комплементарными последовательности-мишени.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат одно или несколько несовпадающих нуклеиновых оснований относительно нуклеиновой кислоты-мишени. В определенных подобных вариантах осуществления антисмысловая активность в отношении мишени снижается за счет такого несовпадения, но активность в отношении молекулы, не являющейся мишенью, снижается на еще большую величину. Таким образом, в определенных подобных вариантах осуществления улучшается избирательность соединения. В определенных вариантах осуществления несовпадение имеет конкретное местоположение в пределах олигонуклеотида, имеющего гэмперный мотив. В определенных подобных вариантах осуществления несовпадение находится в положении 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 от 5'-конца области гэпа. В определенных подобных вариантах осуществления несовпадение находится в положении 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 от 3'-конца области гэпа. В определенных подобных вариантах осуществления несовпадение находится в положении 1, 2, 3 или 4 от 5'-конца фланговой области. В определенных подобных вариантах осуществления несовпадение находится в положении 4, 3, 2 или 1 от 3'-конца фланговой области. В определенных вариантах осуществления несовпадение имеет конкретное местоположение в пределах олигонуклеотида, не имеющего гэмперный мотив. В определенных подобных вариантах осуществления несовпадение находится в положении 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 от 5'-конца олигонуклеотида. В определенных подобных вариантах осуществления несовпадение находится в положении 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 от 3'-конца олигонуклеотида.

Местоположение некомплементарного нуклеинового основания может находиться на 5'-конце или на 3'-конце соединения. В качестве альтернативы, некомплементарные нуклеиновое основание или нуклеиновые основания могут находиться во внутреннем положении-соединения. При наличии двух или более некомплементарных нуклеиновых оснований они могут быть смежными (т.е. связанными) или не смежными. В одном варианте осуществления некомплементарное нуклеиновое основание расположено во фланговом сегменте гэмперного олигонуклеотида.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, длина которых составляет или составляет до 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеиновых оснований, содержат не более 4, не более 3, не более 2 или не более 1 некомплементарного нуклеинового основания относительно нуклеиновой кислоты-мишени, такой как нуклеиновая кислота PCSK9, или ее определенного фрагмента.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, длина которых составляет или составляет до 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеиновых оснований, содержат не более 6, не более 5, не более 4, не более 3, не более 2 или не более 1 некомплементарного нуклеинового основания относительно нуклеиновой кислоты-мишени, такой как нуклеиновая кислота PCSK9, или ее определенного фрагмента.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, также

включают в себя те соединения, которые являются комплементарными фрагменту нуклеиновой кислоты-мишени. Как используется в данном документе, "фрагмент" относится к определенному количеству смежных (т.е. связанных) нуклеиновых оснований в пределах области или сегмента нуклеиновой кислоты-мишени. "Фрагмент" также может относиться к определенному количеству смежных нуклеиновых оснований в соединении. В определенных вариантах осуществления соединения-являются комплементарными фрагменту из по меньшей мере 8 нуклеиновых оснований в сегменте-мишени. В определенных вариантах осуществления соединения являются комплементарными фрагменту из по меньшей мере 9 нуклеиновых оснований в сегменте-мишени. В определенных вариантах осуществления соединения являются комплементарными фрагменту из по меньшей мере 10 нуклеиновых оснований в сегменте-мишени. В определенных вариантах осуществления соединения являются комплементарными фрагменту из по меньшей мере 11 нуклеиновых оснований в сегменте-мишени. В определенных вариантах осуществления соединения являются комплементарными фрагменту из по меньшей мере 12 нуклеиновых оснований в сегменте-мишени. В определенных вариантах осуществления соединения являются комплементарными фрагменту из по меньшей мере 13 нуклеиновых оснований в сегменте-мишени. В определенных вариантах осуществления соединения являются комплементарными фрагменту из по меньшей мере 14 нуклеиновых оснований в сегменте-мишени. В определенных вариантах осуществления соединения являются комплементарными фрагменту из по меньшей мере 15 нуклеиновых оснований в сегменте-мишени. В определенных вариантах осуществления соединения являются комплементарными фрагменту из по меньшей мере 16 нуклеиновых оснований в сегменте-мишени. Также предусматриваются соединения, которые являются комплементарными фрагменту из по меньшей мере 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше нуклеиновых оснований в сегменте-мишени или фрагменту в диапазоне, ограниченном любыми двумя из этих значений.

#### **Идентичность**

Соединения, предусмотренные в данном документе, также могут характеризоваться определенным процентом идентичности с конкретной нуклеотидной последовательностью, SEQ ID NO или соединением, представленным под конкретным номером ION, или их фрагментом. В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, представляют собой бессмысловые соединения или олигомерные соединения. В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, представляют собой модифицированные олигонуклеотиды. Как используется в данном документе, соединение является идентичным последовательности, раскрытой в данном документе, если оно обладает такой же способностью образовывать пары нуклеиновых оснований. Например, РНК, которая содержит урацил вместо тимидина в раскрытой последовательности ДНК, будет считаться идентичной последовательности ДНК, поскольку как урацил, так и тимидин образуют пару с аденином. Также предусматриваются укороченные и удлиненные варианты соединений, описанных в данном документе, а также соединения, имеющие неидентичные основания относительно соединений, предусмотренных в данном документе. Неидентичные основания могут примыкать друг к другу или быть распределены по всему соединению. Процент идентичности соединения рассчитывают по количеству оснований, которые обладают идентичными свойствами образования пар оснований по сравнению с последовательностью, с которой его сравнивают.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, или их фрагменты являются идентичными одному или нескольким соединениям или SEQ ID NO или их фрагменту, раскрытым в данном документе, на величину, составляющую или составляющую по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%. В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, являются идентичными на приблизительно 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% или любую процентную величину между такими значениями по отношению к конкретной нуклеотидной последовательности, SEQ ID NO или соединению, представленному под конкретным номером ION, или их фрагменту, при этом соединения содержат олигонуклеотид, имеющий одно или несколько несовпадающих нуклеиновых оснований. В определенных подобных вариантах осуществления несовпадение находится в положении 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 от 5'-конца олигонуклеотида. В определенных подобных вариантах осуществления несовпадение находится в положении 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 от 3'-конца олигонуклеотида.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат бессмысловые соединения или состоят из них. В определенных вариантах осуществления фрагмент бессмыслового соединения сравнивают с фрагментом равной длины в нуклеиновой кислоте-мишени. В определенных вариантах осуществления фрагмент из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеиновых оснований сравнивают с фрагментом равной длины в нуклеиновой кислоте-мишени.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат олигонуклеотиды или состоят из них. В определенных вариантах осуществления фрагмент олигонуклеотида сравнивают с фрагментом равной длины в нуклеиновой кислоте-мишени. В определенных вариантах осуществления фрагмент из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеиновых оснований сравнивают с фрагментом равной длины в нуклеиновой кислоте-мишени.

### Некоторые модифицированные соединения

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат олигонуклеотиды, состоящие из связанных нуклеозидов, или состоят из них. Олигонуклеотиды могут представлять собой немодифицированные олигонуклеотиды (РНК или ДНК) или могут представлять собой модифицированные олигонуклеотиды. Модифицированные олигонуклеотиды содержат по меньшей мере одну модификацию по сравнению с немодифицированной РНК или ДНК (т.е. содержат по меньшей мере один модифицированный нуклеозид (содержащий модифицированный сахарный компонент и/или модифицированное нуклеиновое основание) и/или по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь).

А. Модифицированные нуклеозиды.

Модифицированные нуклеозиды содержат модифицированный сахарный компонент или модифицированное нуклеиновое основание или как модифицированный сахарный компонент, так и модифицированное нуклеиновое основание.

1. Модифицированные сахарные компоненты.

В определенных вариантах осуществления сахарные компоненты представляют собой небициклические модифицированные сахарные компоненты. В определенных вариантах осуществления модифицированные сахарные компоненты представляют собой бициклические или трициклические сахарные компоненты. В определенных вариантах осуществления модифицированные сахарные компоненты представляют собой имитаторы сахаров. Такие имитаторы сахаров могут содержать одно или несколько замещений, соответствующих замещениям в других типах модифицированных сахарных компонентов.

В определенных вариантах осуществления модифицированные сахарные компоненты представляют собой небициклические модифицированные сахарные компоненты, содержащие фуранозильное кольцо с одним или несколькими ациклическими заместителями, в том числе без ограничения заместителями в 2'-, 4'-и/или 5'-положениях. В определенных вариантах осуществления один или несколько ациклических заместителей в небициклических модифицированных сахарных компонентах являются разветвленными. Примеры 2'-замещающих групп, подходящих для небициклических модифицированных сахарных компонентов, включают без ограничения: 2'-F, 2'-OCH<sub>3</sub> ("ОМЕ" или "О-метил") и 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> ("МОЕ"). В определенных вариантах осуществления 2'-замещающие группы выбраны из галогена, аллила, amino, азидо, SH, CN, OCN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкокси, замещенного O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкокси, O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкила, замещенного O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкил, S-алкила, N(R<sub>m</sub>)-алкила, O-алкенила, S-алкенила, N(R<sub>m</sub>)-алкенила, O-алкинила, S-алкинила, N(R<sub>m</sub>)-алкинила, O-алкиленил-O-алкила, алкинила, алкарила, аралкила, O-алкарила, O-аралкила, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>) или OCH<sub>2</sub>C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), где каждый R<sub>m</sub> и R<sub>n</sub> независимо представляет собой H, защитную группу для аминогруппы или замещенный или незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкил, и 2'-замещающих групп, описанных в Cook et al., U.S. 6531584; Cook et al., U.S. 5859221; и Cook et al., U.S. 6005087. В определенных вариантах осуществления такие 2'-замещающие группы могут быть дополнительно замещены одной или несколькими замещающими группами, независимо выбранными из гидроксила, amino, алкокси, карбокси, бензила, фенил, нитро (NO<sub>2</sub>), тиола, тиоалкокси, тиоалкила, галогена, алкила, арила, алкенила и алкинила. Примеры 4'-замещающих групп, подходящих для линейных небициклических модифицированных сахарных компонентов, включают без ограничения алкокси (например, метокси), алкил и группы, описанные в Manoharan et al., WO 2015/106128. Примеры 5'-замещающих групп, подходящих для небициклических модифицированных сахарных компонентов, включают без ограничения: 5'-метил (R или S), 5'-винил и 5'-метокси. В определенных вариантах осуществления небициклические модифицированные сахара содержат более одного немостикового заместителя в сахаре, например, в случае с 2'-F-5'-метил-модифицированными сахарными компонентами, а также модифицированными сахарными компонентами и модифицированными нуклеозидами, описанными в Migawa et al., US2010/190837 и Rajeev et al., US2013/0203836.

В определенных вариантах осуществления 2'-замещенный нуклеозид или небициклический 2'-модифицированный нуклеозид содержит сахарный компонент, содержащий линейную 2'-замещающую группу, выбранную из: F, NH<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> и N-замещенного ацетамида (OCH<sub>2</sub>C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>)), где каждый R<sub>m</sub> и R<sub>n</sub> независимо представляет собой H, защитную группу для аминогруппы или замещенный или незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкил.

В определенных вариантах осуществления 2'-замещенный нуклеозид или небициклический 2'-модифицированный нуклеозид содержит сахарный компонент, содержащий линейную 2'-замещающую группу, выбранную из: F, OCF<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> и OCH<sub>2</sub>C(=O)-N(H)CH<sub>3</sub> ("NMA").

В определенных вариантах осуществления 2'-замещенный нуклеозид или небициклический 2'-модифицированный нуклеозид содержит сахарный компонент, содержащий линейную 2'-замещающую группу, выбранную из: F, OCH<sub>3</sub> и OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>.

Нуклеозиды, содержащие модифицированные сахарные компоненты, такие как небициклические модифицированные сахарные компоненты, обозначают по положению(положениям) замещения(замещений) в сахарном компоненте нуклеозида. Например, нуклеозиды, содержащие 2'-замещенные

или 2-модифицированные сахарные компоненты, называют 2'-замещенными нуклеозидами или 2-модифицированными нуклеозидами.

Определенные модифицированные сахарные компоненты содержат мостиковый заместитель в сахаре, который образует второе кольцо, в результате чего образуется бициклический сахарный компонент. В определенных подобных вариантах осуществления бициклический сахарный компонент содержит мостик между 4'- и 2'-атомами фуранозного кольца. Примеры таких 4'-2'-мостиковых заместителей в сахаре включают без ограничения: 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' ("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' (называемый "конформационно ограничивающим этилом" или "сEt" в S-конфигурации), 4'-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-2', 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-2', 4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2' ("конформационно ограничивающий MOE" или "сMOE") и его аналоги (см., например, Seth et al., U.S. 7399845, Bhat et al., U.S. 7569686, Swayze et al., U.S. 7741457, и Swayze et al., U.S. 8022193), 4'-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)-O-2' и его аналоги (см., например, Seth et al., U.S. 8278283), 4'-CH<sub>2</sub>-N(OCH<sub>3</sub>)-2' и его аналоги (см., например, Prakash et al., U.S. 8278425), 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-2' (см., например, Allerson et al., U.S. 7696345 и Allerson et al., U.S. 8124745), 4'-CH<sub>2</sub>-C(H)(CH<sub>3</sub>)-2' (см., например, Zhou, et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134), 4'-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-2' и его аналоги (см., например, Seth et al., U.S. 8278426), 4'-C(R<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)-N(R)-O-2', 4'-C(R<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)-O-N(R)-2', 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(R)-2' и 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2', где каждый R, R<sub>a</sub> и R<sub>b</sub> независимо представляет собой H, защитную группу или C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкил (см., например, Imanishi et al., U.S. 7427672).

В определенных вариантах осуществления такие 4'-2'-мостики независимо содержат от 1 до 4 связанных групп, независимо выбранных из: -[C(R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)]<sub>n</sub>-, -[C(R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)]<sub>n</sub>-O-, -C(R<sub>a</sub>)=C(R<sub>b</sub>)-, -C(R<sub>a</sub>)=N-, -C(=NR<sub>a</sub>)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R<sub>a</sub>)<sub>2</sub>-, -S(=O)<sub>x</sub>- и -N(R<sub>a</sub>)-;

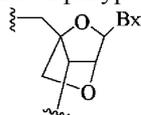
где x равняется 0, 1 или 2;

n равняется 1, 2, 3 или 4;

каждый R<sub>a</sub> и R<sub>b</sub> независимо представляет собой H, защитную группу, гидроксил, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкил, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкенил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкинил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкинил, C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>-арил, замещенный C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>-арил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, гетероарил, замещенный гетероарил, алициклический C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>-радикал, замещенный алициклический C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>-радикал, галоген, OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, COOJ<sub>1</sub>, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, CN, сульфонил (S(=O)<sub>2</sub>-J<sub>1</sub>) или сульфоксил (S(=O)-J<sub>1</sub>); и каждый J<sub>1</sub> и J<sub>2</sub> независимо представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкил, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкенил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкинил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкинил, C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>-арил, замещенный C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>-арил, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-аминоалкил, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-аминоалкил или защитную группу.

Дополнительные бициклические сахарные компоненты известны из уровня техники, см., например: Freier et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4429-4443, Albaek et al., J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-7740, 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. Opin. Invert. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7; Orum et al., Curr. Opin. Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; Wengel et al., U.S. 7053207, Imanishi et al., U.S. 6268490, Imanishi et al., U.S. 6770748, Imanishi et al., U.S. RE44779; Wengel et al., U.S. 6794499, Wengel et al., U.S. 6670461; Wengel et al., U.S. 7034133, Wengel et al., U.S. 8080644; Wengel et al., U.S. 8034909; Wengel et al., U.S. 8153365; Wengel et al., U.S. 7572582; и Ramasamy et al., U.S. 6525191, Torsten et al., WO 2004/106356, Wengel et al., WO 1999/014226; Seth et al., WO 2007/134181; Seth et al., U.S. 7547684; Seth et al., U.S. 7666854; Seth et al., U.S. 8088746; Seth et al., U.S. 7750131; Seth et al., U.S. 8030467; Seth et al., U.S. 8268980; Seth et al., U.S. 8546556; Seth et al., U.S. 8530640; Migawa et al., U.S. 9012421; Seth et al., U.S. 8501805; Allerson et al., US2008/0039618; и Migawa et al., US2015/0191727.

В определенных вариантах осуществления бициклические сахарные компоненты и нуклеозиды, в состав которых включены такие бициклические сахарные компоненты, дополнительно определяются изомерной конфигурацией. Например, нуклеозид LNA (описанный в данном документе) может находиться в конфигурации α-L или в конфигурации β-D.



LNA (β-D-конфигурация)  
мостик = 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'



α-L-LNA (α-L-конфигурация)  
мостик = 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'

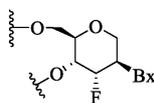
α-L-метиленокси-модифицированные (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') или имеющие конфигурацию α-L-LNA бициклические нуклеозиды были включены в состав олигонуклеотидов, которые демонстрировали антисмысловую активность (Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 27, 6365-6372). В данном документе общее описание бициклических нуклеозидов включает обе изомерные конфигурации. Если положения конкретных бициклических нуклеозидов (например, LNA или сEt) идентифицированы в проиллюстрирован-

ных в данном документе на примерах вариантах осуществления, то они находятся в конфигурации  $\beta$ -D, если не указано иное.

В определенных вариантах осуществления модифицированные сахарные компоненты содержат один или несколько немоستيковых заместителей в сахаре и один или несколько мостиговых заместителей в сахаре (например, в случае с 5'-замещенными и содержащими 4'-2'-мостик сахарами).

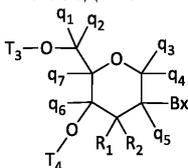
В определенных вариантах осуществления модифицированные сахарные компоненты представляют собой имитаторы сахаров. В определенных подобных вариантах осуществления атом кислорода в сахарном компоненте заменен, например, атомом серы, углерода или азота. В определенных подобных вариантах осуществления такие модифицированные сахарные компоненты также содержат мостиговые и/или немоستيковые заместители, описанные в данном документе. Например, определенные имитаторы сахаров содержат 4'-атом серы и замещение в 2'-положении (см., например, Bhat et al., U.S. 7875733, и Bhat et al., U.S. 7939677) и/или в 5'-положении.

В определенных вариантах осуществления имитаторы сахаров содержат кольца с числом атомов, отличным от 5. Например, в определенных вариантах осуществления имитатор сахара содержит шестичленный тетрагидропиран ("ТНР"). Такие тетрагидропираны могут быть дополнительно модифицированными или замещенными. Нуклеозиды, содержащие такие модифицированные тетрагидропираны, включают без ограничения гексит-нуклеиновую кислоту ("HNA"), аннит-нуклеиновую кислоту ("ANA"), маннит-нуклеиновую кислоту ("MNA") (см., например, Leumann, CJ. Bioorg. & Med. Chem. 2002, 10, 841-854), фтор-HNA:



F-HNA

("F-HNA", см., например, Swayze et al., U.S. 8088904; Swayze et al., U.S. 8440803; и Swayze et al., U.S. 9005906, F-HNA также может называться F-ТНР или 3'-фтортетрагидропираном) и нуклеозиды, содержащие дополнительные модифицированные соединения ТНР следующей формулы:



где независимо для каждого указанного модифицированного ТНР-нуклеозида:

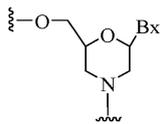
Bx представляет собой компонент, являющийся нуклеиновым основанием;

каждый из T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub> независимо представляет собой межнуклеозидную связывающую группу, связывающую модифицированный ТНР-нуклеозид с остальной частью олигонуклеотида, или один из T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub> представляет собой межнуклеозидную связывающую группу, связывающую модифицированный ТНР-нуклеозид с остальной частью олигонуклеотида, а другой из T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub> представляет собой H, защитную группу для гидроксильной группы, связанную конъюгированную группу или 5'- или 3'-концевую группу;

каждый из q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub>, q<sub>3</sub>, q<sub>4</sub>, q<sub>5</sub>, q<sub>6</sub> и q<sub>7</sub> независимо представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинил или замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинил; и каждый из R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> независимо выбран из водорода, галогена, замещенного или незамещенного алкокси, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, и CN, где X представляет собой O, S или NJ<sub>1</sub>, а каждый из J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub>, и J<sub>3</sub> независимо представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил.

В определенных вариантах осуществления предусмотрены модифицированные ТНР-нуклеозиды, где каждый из q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub>, q<sub>3</sub>, q<sub>4</sub>, q<sub>5</sub>, q<sub>6</sub> и q<sub>7</sub> представляет собой H. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один из q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub>, q<sub>3</sub>, q<sub>4</sub>, q<sub>5</sub>, q<sub>6</sub> и q<sub>7</sub> является отличным от H. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один из q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub>, q<sub>3</sub>, q<sub>4</sub>, q<sub>5</sub>, q<sub>6</sub> и q<sub>7</sub> представляет собой метил. В определенных вариантах осуществления предусмотрены модифицированные ТНР-нуклеозиды, где один из R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> представляет собой F. В определенных вариантах осуществления R<sub>1</sub> представляет собой F, а R<sub>2</sub> представляет собой H, в определенных вариантах осуществления R<sub>1</sub> представляет собой метокси, а R<sub>2</sub> представляет собой H, и в определенных вариантах осуществления R<sub>1</sub> представляет собой метоксизтокси, а R<sub>2</sub> представляет собой H.

В определенных вариантах осуществления имитаторы сахаров содержат кольца, содержащие более 5 атомов и более одного гетероатома. Например, сообщалось о нуклеозидах, содержащих морфолиновые сахарные компоненты, и об их применении в олигонуклеотидах (см., например, Braasch et al., Biochemistry, 2002, 41, 4503-4510 и Summerton et al., U.S. 5698685; Summerton et al., U.S. 5166315; Summerton et al., U.S. 5185444; and Summerton et al., U.S. 5034506). Используемый в данном документе термин "морфолиновый компонент" означает имитатор сахара со следующей структурой:



В определенных вариантах осуществления морфолиновые компоненты могут быть модифицированы, например, путем добавления или изменения различных замещающих групп в приведенной выше структуре морфолинового компонента. Такие имитаторы сахаров в данном документе называются "модифицированными морфолиновыми компонентами".

В определенных вариантах осуществления имитаторы сахаров содержат ациклические компоненты. Примеры нуклеозидов и олигонуклеотидов, содержащих такие ациклические имитаторы сахаров, включают без ограничения пептидную нуклеиновую кислоту ("PNA"), ациклическую бутил-нуклеиновую кислоту (см., например, Kumar et al., *Org. Biomol. Chem.*, 2013, 77, 5853-5865), а также нуклеозиды и олигонуклеотиды, описанные в Manoharan et al., US2013/130378.

Из уровня техники известны многие другие бициклические и трициклические кольцевые системы сахаров и имитаторов сахаров, которые могут применяться в модифицированных нуклеозидах.

## 2. Модифицированные нуклеиновые основания.

Нуклеиновые основания (или основания) с модификациями или замещениями структурно отличаются от встречающихся в природе или синтетических немодифицированных нуклеиновых оснований, но являются функционально взаимозаменяемыми с ними. В образовании водородных связей могут принимать участие как природные, так и модифицированные нуклеиновые основания. Такие модификации нуклеиновых оснований могут придавать антисмысловым соединениям стабильность к действию нуклеаз, родство связывания или некоторое другое благоприятное биологическое свойство.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат модифицированные олигонуклеотиды. В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат один или несколько нуклеозидов, содержащих немодифицированное нуклеиновое основание. В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат один или несколько нуклеозидов, содержащих модифицированное нуклеиновое основание. В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат один или несколько нуклеозидов, которые не содержат нуклеиновое основание, называемых нуклеозидами с удаленными азотистыми основаниями.

В определенных вариантах осуществления модифицированные нуклеиновые основания выбраны из: 5-замещенных пиримидинов, 6-азапиримидинов, алкил- или алкинилзамещенных пиримидинов, алкилзамещенных пуринов и N-2-, N-6- и O-6-замещенных пуринов. В определенных вариантах осуществления модифицированные нуклеиновые основания выбраны из: 2-аминопропиладенина, 5-гидроксиметилцитозина, 5-гидроксиметилцитозина, 5-метилцитозина, ксантина, гипоксантина, 2-аминоаденина, 6-N-метилгуанина, 6-N-метиладенина, 2-пропиладенина, 2-тиоурацила, 2-тиотимина и 2-тиоцитозина, 5-пропинил(C≡C-CH<sub>3</sub>)-урацила, 5-пропинилцитозина, 6-азоурацила, 6-азоцитозина, 6-азотимина, 5-рибозилурацила (псевдоурацила), 4-тиоурацила, 8-галогена, 8-амино, 8-тиола, 8-тиоалкила, 8-гидроксила, 8-аза и других 8-замещенных пуринов, 5-галогена, в частности, 5-брома, 5-трифторметила, 5-галогенурацила и 5-галогенцитозина, 7-метилгуанина, 7-метиладенина, 2-F-аденина, 2-аминоаденина, 7-дезазагуанина, 7-дезазааденина, 3-дезазагуанина, 3-дезазааденина, 6-N-бензоиладенина, 2-N-изобутирилгуанина, 4-N-бензоилцитозина, 4-N-бензоилурацила, 5-метил-4-N-бензоилцитозина, 5-метил-4-N-бензоилурацила, универсальных оснований, гидрофобных оснований, оснований, обладающих способностью к неспецифическому спариванию, оснований с увеличенным размером и фторированных оснований. Дополнительные модифицированные нуклеиновые основания включают в себя трициклические пиримидины, такие как 1,3-диазафеноксазин-2-он, 1,3-диазафенотиазин-2-он и 9-(2-аминоэтоксид)-1,3-диазафеноксазин-2-он (G-образный зажим). Модифицированные нуклеиновые основания также могут включать в себя нуклеиновые основания, в которых пуриновое или пиримидиновое основание заменено другими гетероциклами, например, 7-дезазаденином, 7-дезазагуанозинном, 2-аминопиридином и 2-пиридином. Дополнительные нуклеиновые основания включают в себя нуклеиновые основания, раскрытые в Merigan et al., U.S. 3687808, нуклеиновые основания, раскрытые в The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, Kroschwitz, J.I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858-859; Englisch et al., *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613; Sanghvi, Y.S., Chapter 15, *Antisense Research and Applications*, Crooke, S.T. and Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993, 273-288; и нуклеиновые основания, раскрытые в главах 6 и 15 *Antisense Drug Technology*, Crooke S.T., Ed., CRC Press, 2008, на страницах 163-166 и 442-443.

Публикации, в которых изложено получение некоторых из вышеупомянутых модифицированных нуклеиновых оснований, а также других модифицированных нуклеиновых оснований, включают без ограничения Manoharan et al., US2003/0158403, Manoharan et al., US2003/0175906; Dinh et al., U.S. 4845205; Spielvogel et al., U.S. 5130302; Rogers et al., U.S. 5134066; Bischofberger et al., U.S. 5175273; Urdea et al., U.S. 5367066; Benner et al., U.S. 5432272; Matteucci et al., U.S. 5434257; Gmeiner et al., U.S. 5457187; Cook et al., U.S. 5459255; Froehler et al., U.S. 5484908; Matteucci et al., U.S. 5502177; Hawkins et al., U.S.

5525711; Haralambidis et al., U.S. 5552540; Cook et al., U.S. 5587469; Froehler et al., U.S. 5594121; Switzer et al., U.S. 5596091; Cook et al., U.S. 5614617; Froehler et al., U.S. 5645985; Cook et al., U.S. 5681941; Cook et al., U.S. 5811534; Cook et al., U.S. 5750692; Cook et al., U.S. 5948903; Cook et al., U.S. 5587470; Cook et al., U.S. 5457191; Matteucci et al., U.S. 5763588; Froehler et al., U.S. 5830653; Cook et al., U.S. 5808027; Cook et al., U.S. 6166199; и Matteucci et al., U.S. 6005096.

В определенных вариантах осуществления соединения, нацеливающиеся на нуклеиновую кислоту PCSK9, содержат одно или несколько модифицированных нуклеиновых оснований. В определенных вариантах осуществления модифицированное нуклеиновое основание представляет собой 5'-метилцитозин. В определенных вариантах осуществления каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

### 3. Модифицированные межнуклеозидные связи.

Встречающаяся в природе межнуклеозидная связь в РНК и ДНК представляет собой 3'-5'-фосфодиэфирную связь. В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, имеющие одну или несколько модифицированных, т.е. не встречающихся в природе, межнуклеозидных связей, зачастую предпочтительнее антисмысловых соединений со встречающимися в природе межнуклеозидными связями благодаря их желательным свойствам, таким как, например, повышенное поглощение клетками, повышенное родство с нуклеиновыми кислотами-мишенями и увеличенная стабильность в присутствии нуклеаз.

В определенных вариантах осуществления соединения, нацеливающиеся на нуклеиновую кислоту PCSK9, содержат одну или несколько модифицированных межнуклеозидных связей. В определенных вариантах осуществления модифицированные межнуклеозидные связи представляют собой фосфотиоатные связи. В определенных вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь антисмыслового соединения представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат олигонуклеотиды. Олигонуклеотиды с модифицированными межнуклеозидными связями содержат межнуклеозидные связи, в которых сохраняется атом фосфора, а также межнуклеозидные связи, которые не имеют атома фосфора. Иллюстративные фосфорсодержащие межнуклеозидные связи включают без ограничения фосфодиэфирные, фосфотриэфирные, метилфосфонатные, фосфорамидатные и фосфотиоатные связи. Хорошо известны способы получения фосфорсодержащих и не содержащих фосфор связей.

В определенных вариантах осуществления нуклеозиды модифицированных олигонуклеотидов могут быть связаны друг с другом с помощью любой межнуклеозидной связи. Два основных класса межнуклеозидных связывающих групп определяются наличием или отсутствием атома фосфора. Иллюстративные фосфорсодержащие межнуклеозидные связи включают в себя без ограничений фосфатные связи, которые охватывают фосфодиэфирную связь ("P=O") (также называемые немодифицированными или встречающимися в природе связями), фосфотриэфирные, метилфосфонатные, фосфорамидатные, а также фосфотиоатные ("P=S") и фосфодитиоатные ("HS-P=S") связи. Иллюстративные не содержащие фосфор межнуклеозидные связывающие группы включают без ограничения метилметилиминогруппу (-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>-), тиодифирную, тиокарбаматную (-O-C(=O)(NH)-S-); силоксановую (-O-SiH<sub>2</sub>-O-) и N,N'-диметилгидразиновою (-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)-) группы. Модифицированные межнуклеозидные связи, в отличие от встречающихся в природе фосфатных связей, можно использовать для изменения, как правило, увеличения, устойчивости олигонуклеотида к действию нуклеаз. В определенных вариантах осуществления межнуклеозидные связи, имеющие хиральный атом, можно получать в виде рацемической смеси или в виде отдельных энантиомеров. Иллюстративные хиральные межнуклеозидные связи включают без ограничения алкилфосфонатные и фосфотиоатные связи. Специалистам в данной области хорошо известны способы получения фосфорсодержащих и не содержащих фосфор межнуклеозидных связей.

Нейтральные межнуклеозидные связи включают без ограничения фосфотриэфирные, метилфосфонатные связи, MMI (3'-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-5'), 3-амидную (3'-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(H)-5'), 4-амидную (3'-CH<sub>2</sub>-N(H)-C(=O)-5'), формацетальную (3'-O-CH<sub>2</sub>-O-5'), метоксипропильную и тиоформацетальную связи (3'-S-CH<sub>2</sub>-O-5'). Дополнительные нейтральные межнуклеозидные связи включают неионные связи, включающие силоксановую (диалкилсилоксановую), карбоксилатную сложноэфирную, карбоксамидную, сульфонатную сложноэфирную и амидные связи (см., например: Carbohydrate Modifications in Antisense Research; Y.S. Sanghvi and P.D. Cook, Eds., ACS Symposium Series 580; Chapters 3 and 4, 40-65). Дополнительные нейтральные межнуклеозидные связи включают неионные связи, содержащие комбинацию составляющих частей N, O, S и CH<sub>2</sub>.

В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды содержат модифицированные межнуклеозидные связи, расположенные вдоль олигонуклеотида или его области в виде определенного характерного участка или мотива из модифицированных межнуклеозидных связей. В определенных вариантах осуществления межнуклеозидные связи расположены в виде мотива, содержащего гзп. В таких вариантах осуществления межнуклеозидные связи в каждой из двух фланговых областей отличаются от межнуклеозидных связей в области гзпа. В определенных вариантах осуществления межнуклеозидные связи во флангах являются фосфодиэфирными, а межнуклеозидные связи в гзпе являются фосфотиоатными. Нуклеозидный мотив выбирают независимо, так что такие олигонуклеотиды, имеющие мотив из

межнуклеозидных связей, содержащий гэта, могут иметь или не иметь нуклеозидный мотив, содержащий гэта, и если они действительно имеют нуклеозидный мотив, содержащий гэта, то длина флангов и гэта может быть или не быть одинаковой.

В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды содержат область, имеющую чередующийся мотив из межнуклеозидных связей. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды содержат область с однородно модифицированными межнуклеозидными связями. В определенных подобных вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область, имеющую однородные связи, представляющие собой фосфотиоатные межнуклеозидные связи. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид имеет однородные фосфотиоатные связи. В определенных вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь олигонуклеотида выбрана из фосфодизфирной и фосфотиоатной. В определенных вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь олигонуклеотида выбрана из фосфодизфирной и фосфотиоатной, и по меньшей мере одна межнуклеозидная связь является фосфотиоатной.

В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере 6 фосфотиоатных межнуклеозидных связей. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере 8 фосфотиоатных межнуклеозидных связей. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере 10 фосфотиоатных межнуклеозидных связей. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок, состоящий из по меньшей мере 6 последовательно расположенных фосфотиоатных межнуклеозидных связей. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок, состоящий из по меньшей мере 8 последовательно расположенных фосфотиоатных межнуклеозидных связей. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок, состоящий из по меньшей мере 10 последовательно расположенных фосфотиоатных межнуклеозидных связей. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок, состоящий из по меньшей мере 12 последовательно расположенных фосфотиоатных межнуклеозидных связей. В определенных подобных вариантах осуществления по меньшей мере один такой блок расположен на 3'-конце олигонуклеотида. В определенных подобных вариантах осуществления по меньшей мере один такой блок расположен в пределах 3 нуклеозидов на 3'-конце олигонуклеотида.

В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды содержат одну или несколько метилфосфонатных связей. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды, имеющие гэтамерный нуклеозидный мотив, содержат мотив из связей, содержащий связи, все из которых являются фосфотиоатными, за исключением одной или двух метилфосфонатных связей. В определенных вариантах осуществления одна метилфосфонатная связь находится в центральном гэтае олигонуклеотида, имеющего гэтамерный нуклеозидный мотив.

В определенных вариантах осуществления желателно упорядочить количество фосфотиоатных межнуклеозидных связей и фосфодизфирных межнуклеозидных связей для сохранения устойчивости к действию нуклеаз. В определенных вариантах осуществления желателно упорядочить количество и положение фосфотиоатных межнуклеозидных связей и количество и положение фосфодизфирных межнуклеозидных связей для сохранения устойчивости к действию нуклеаз. В определенных вариантах осуществления количество фосфотиоатных межнуклеозидных связей можно уменьшить, а количество фосфодизфирных межнуклеозидных связей можно увеличить. В определенных вариантах осуществления количество фосфотиоатных межнуклеозидных связей можно уменьшить, а количество фосфодизфирных межнуклеозидных связей можно увеличить, при этом по-прежнему сохраняя устойчивость к действию нуклеаз. В определенных вариантах осуществления желателно уменьшить количество фосфотиоатных межнуклеозидных связей, при этом по-прежнему поддерживая устойчивость к действию нуклеаз. В определенных вариантах осуществления желателно увеличить количество фосфодизфирных межнуклеозидных связей, при этом по-прежнему поддерживая устойчивость к действию нуклеаз.

#### 4. Некоторые мотивы.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат олигонуклеотиды. Олигонуклеотиды могут иметь мотив, например, характерный участок из немодифицированных и/или модифицированных сахарных компонентов, нуклеиновых оснований и/или межнуклеозидных связей. В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат один или несколько модифицированных нуклеозидов, содержащих модифицированный сахар. В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат один или несколько модифицированных нуклеозидов, содержащих модифицированное нуклеиновое основание. В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат одну или несколько модифицированных межнуклеозидных связей. В таких вариантах осуществления характерный участок или мотив определяют модифицированные, немодифицированные и модифицированные разными способами сахарные компоненты, нуклеиновые основания и/или межнуклеозидные связи модифицированного олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления каждый характерный участок из сахарных компонентов, нуклеиновых оснований и межнуклеозидных связей является независимым от других. Таким образом, модифицированный олигонуклеотид можно описать с помощью его мотива из

сахаров, мотива из нуклеиновых оснований и/или мотива из межнуклеозидных связей (как используется в данном документе, мотив из нуклеиновых оснований описывает модификации нуклеиновых оснований независимо от последовательности нуклеиновых оснований).

а. Некоторые мотивы из сахаров.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат олигонуклеотиды. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды содержат один или несколько типов модифицированных сахарных и/или немодифицированных сахарных компонентов, расположенных вдоль олигонуклеотида или его области в виде определенного характерного участка или мотива из сахаров. В некоторых случаях такие мотивы из сахаров включают без ограничения любые обсуждаемые в данном документе модификации сахаров.

В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат область, имеющую гэмперный мотив, которая содержит две внешние области, или "фланги", и центральную или внутреннюю область, или "гэп", или состоит из нее. Три области гэмперного мотива (5'-фланг, гэп и 3'-фланг) образуют непрерывную последовательность нуклеозидов, в которой по меньшей мере некоторые сахарные компоненты нуклеозидов каждого из флангов отличаются от по меньшей мере некоторых сахарных компонентов нуклеозидов гэпа. В частности, по меньшей мере сахарные компоненты нуклеозидов каждого фланга, которые располагаются ближе всего к гэпу (самого крайнего 3'-концевого нуклеозида 5'-фланга и самого крайнего 5'-концевого нуклеозида 3'-фланга), отличаются от сахарных компонентов соседних нуклеозидов гэпа, что таким образом определяет границу между флангами и гэпом (т.е. точку сочленения фланга и гэпа). В определенных вариантах осуществления все сахарные компоненты в гэпе являются одинаковыми. В определенных вариантах осуществления гэп содержит один или несколько нуклеозидов, имеющих сахарный компонент, который отличается от сахарного компонента одного или нескольких других нуклеозидов гэпа. В определенных вариантах осуществления все сахарные мотивы двух флангов являются одинаковыми (симметричный гэмпер). В определенных вариантах осуществления сахарный мотив 5'-фланга отличается от сахарного мотива 3'-фланга (асимметричный гэмпер).

В определенных вариантах осуществления фланги гэмпера содержат 1-5 нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления фланги гэмпера содержат 2-5 нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления фланги гэмпера содержат 3-5 нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления все нуклеозиды гэмпера являются модифицированными нуклеозидами.

В определенных вариантах осуществления гэп гэмпера содержит 7-12 нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления гэп гэмпера содержит 7-10 нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления гэп гэмпера содержит 8-10 нуклеозидов. В определенном варианте осуществления каждый нуклеозид гэпа гэмпера является немодифицированным 2'-дезоксинуклеозидом.

В определенных вариантах осуществления гэмпер является дезоксигэмпером. В таких вариантах осуществления нуклеозиды со стороны гэпа от каждой точки сочленения фланга и гэпа являются немодифицированными 2'-дезоксинуклеозидами, а нуклеозиды со стороны фланга от каждой точки сочленения фланга и гэпа являются модифицированными нуклеозидами. В определенных подобных вариантах осуществления каждый нуклеозид гэпа является немодифицированным 2'-дезоксинуклеозидом. В определенных подобных вариантах осуществления каждый нуклеозид каждого фланга является модифицированным нуклеозидом.

В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет полностью модифицированный мотив из сахаров, при этом каждый нуклеозид модифицированного олигонуклеотида содержит модифицированный сахарный компонент. В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат область, имеющую полностью модифицированный мотив из сахаров, или состоят из нее, при этом каждый нуклеозид области содержит модифицированный сахарный компонент. В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат область, имеющую полностью модифицированный мотив из сахаров, или состоят из нее, при этом каждый нуклеозид в полностью модифицированной области содержит одинаковый модифицированный сахарный компонент, и такой участок называется в данном документе однородно модифицированным мотивом из сахаров. В определенных вариантах осуществления полностью модифицированный олигонуклеотид является однородно модифицированным олигонуклеотидом. В определенных вариантах осуществления каждый нуклеозид однородно модифицированного олигонуклеотида содержит одинаковую 2'-модификацию.

В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид может содержать мотив из сахаров, описанный в Swayze et al., US2010/0197762; Freier et al., US2014/0107330; Freier et al., US2015/0184153; и Seth et al., US2015/0267195, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

б. Некоторые мотивы из нуклеиновых оснований.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат олигонуклеотиды. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды содержат модифицированные и/или немодифицированные нуклеиновые основания, расположенные вдоль олигонуклеотида

или его области в виде определенного характерного участка или мотива. В определенных вариантах осуществления каждое нуклеиновое основание является модифицированным. В определенных вариантах осуществления ни одно из нуклеиновых оснований не является модифицированным. В определенных вариантах осуществления каждый пурин или каждый пиримидин являются модифицированными. В определенных вариантах осуществления каждый аденин является модифицированным. В определенных вариантах осуществления каждый гуанин является модифицированным. В определенных вариантах осуществления каждый тимин является модифицированным. В определенных вариантах осуществления каждый урацил является модифицированным. В определенных вариантах осуществления каждый цитозин является модифицированным. В определенных вариантах осуществления некоторые или все цитозиновые нуклеиновые основания в модифицированном олигонуклеотиде представляют собой 5-метилцитозин.

В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат блок из модифицированных нуклеиновых оснований. В определенных подобных вариантах осуществления блок располагается на 3'-конце олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления блок расположен в пределах 3 нуклеозидов на 3'-конце олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления блок находится на 5'-конце олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления блок расположен в пределах 3 нуклеозидов на 5'-конце олигонуклеотида.

В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды, имеющие гэмперный мотив, содержат нуклеозид, содержащий модифицированное нуклеиновое основание. В определенных подобных вариантах осуществления один нуклеозид, содержащий модифицированное нуклеиновое основание, находится в центральном гэпе олигонуклеотида, имеющего гэмперный мотив. В определенных подобных вариантах осуществления сахарный компонент указанного нуклеозида представляет собой 2'-дезоксирибозильный компонент. В определенных вариантах осуществления модифицированное нуклеиновое основание выбрано из 2-тиопиримидина и 5-пропинпиримидина.

с. Некоторые мотивы из межнуклеозидных связей.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат олигонуклеотиды. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды содержат модифицированные и/или немодифицированные межнуклеозидные связи, расположенные вдоль олигонуклеотида или его области в виде определенного характерного участка или мотива. В определенных вариантах осуществления фактически каждая межнуклеозидная связывающая группа представляет собой фосфатную межнуклеозидную связь ( $P=O$ ). В определенных вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связывающая группа модифицированного олигонуклеотида является фосфотиоатной ( $P=S$ ). В определенных вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связывающая группа модифицированного олигонуклеотида независимо выбрана из фосфотиоатной и фосфатной межнуклеозидных связей. В определенных вариантах осуществления мотив из сахаров модифицированного олигонуклеотида представляет собой гэмпер, а все межнуклеозидные связи в гэпе являются модифицированными. В определенных подобных вариантах осуществления некоторые или все межнуклеозидные связи во флангах являются немодифицированными фосфатными связями. В определенных вариантах осуществления концевые межнуклеозидные связи являются модифицированными.

5. Некоторые модифицированные олигонуклеотиды.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат модифицированные олигонуклеотиды. В определенных вариантах осуществления вышеприведенные модификации (сахаров, нуклеиновых оснований, межнуклеозидных связей) включены в состав модифицированного олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды характеризуются по их модификации, мотивам и значениям общей длины. В определенных вариантах осуществления каждый из таких параметров является независимым от других. Таким образом, если не указано иное, каждая межнуклеозидная связь олигонуклеотида, имеющего гэмперный мотив из сахаров, может быть модифицированной или немодифицированной и может соответствовать или не соответствовать гэмперному характеру модификаций сахаров. Например, межнуклеозидные связи во фланговых областях гэмпера из сахаров могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга и могут быть такими же, как межнуклеозидные связи в области гэмпа мотива из сахаров, или отличными от них. Аналогичным образом, такие гэмперные олигонуклеотиды могут содержать одно или несколько модифицированных нуклеиновых оснований независимо от гэмперного характера модификаций сахаров. Кроме того, в некоторых случаях олигонуклеотид описывается общей длиной или диапазоном длин или длинами или диапазонами длин двух или более областей (например, областей из нуклеозидов, имеющих указанные модификации сахаров), при таких обстоятельствах может быть возможным выбрать для каждого диапазона такие количества, которые в результате обеспечивают олигонуклеотид, имеющий общую длину, выходящую за пределы указанного диапазона. При таких обстоятельствах должны быть удовлетворены требования к обоим элементам. Например, в определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид состоит из 15-20 связанных нуклеозидов и имеет мотив из сахаров, состоящий из трех областей, А, В и С, где область А состоит из 2-6 связанных нуклеозидов, имеющих указанный мотив из сахаров, область В состоит из 6-10 связанных нуклеозидов, имеющих указанный мотив из сахаров, и область С состоит из 2-6 связанных нуклеозидов, имеющих указанный мотив из сахаров. Такие варианты

осуществления не включают модифицированные олигонуклеотиды, в которых каждая из А и С состоит из 6 связанных нуклеозидов, а В состоит из 10 связанных нуклеозидов (несмотря на то, что эти количества нуклеозидов являются допустимыми согласно требованиям к А, В и С), поскольку общая длина такого олигонуклеотида составляет 22, что превышает верхний предел общей длины модифицированного олигонуклеотида (20). В данном документе, если в описании олигонуклеотида ничего не говорится относительно одного или нескольких параметров, то такой параметр не ограничен. Таким образом, модифицированный олигонуклеотид, описываемый только как имеющий гэмперный мотив из сахаров без дополнительного описания, может иметь любую длину, любой мотив из межнуклеозидных связей и любой мотив из нуклеиновых оснований. Если не указано иное, все модификации являются независимыми от последовательности нуклеиновых оснований.

#### **Некоторые конъюгированные соединения**

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат олигонуклеотид (модифицированный или немодифицированный) и необязательно одну или несколько конъюгированных групп и/или концевых групп или состоят из них. Конъюгированные группы состоят из одного или нескольких конъюгированных компонентов и конъюгирующего линкера, который связывает конъюгированный компонент с олигонуклеотидом. Конъюгированные группы могут быть присоединены к любому одному или обоим концам олигонуклеотида и/или в любом внутреннем положении. В определенных вариантах осуществления конъюгированные группы присоединены к нуклеозиду модифицированного олигонуклеотида в 2'-положении. В определенных вариантах осуществления конъюгированные группы, присоединенные к любому одному или обоим концам олигонуклеотида, являются концевыми группами. В определенных подобных вариантах осуществления конъюгированные группы или концевые группы присоединены на 3'- и/или 5'-конце олигонуклеотидов. В определенных подобных вариантах осуществления конъюгированные группы (или концевые группы) присоединены на 3'-конце олигонуклеотидов. В определенных вариантах осуществления конъюгированные группы присоединены возле 3'-конца олигонуклеотидов. В определенных вариантах осуществления конъюгированные группы (или концевые группы) присоединены на 5'-конце олигонуклеотидов. В определенных вариантах осуществления конъюгированные группы присоединены возле 5'-конца олигонуклеотидов.

В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид является модифицированным. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид соединения имеет последовательность нуклеиновых оснований, которая комплементарна нуклеиновой кислоте-мишени. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды являются комплементарными матричной РНК (mRNA). В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды являются комплементарными смысловому транскрипту.

Примеры концевых групп включают без ограничения конъюгированные группы, кэп-группы, фосфатные компоненты, защитные группы, модифицированные или немодифицированные нуклеозиды и два или более нуклеозидов, которые независимо являются модифицированными или немодифицированными.

#### **А. Некоторые конъюгированные группы.**

В определенных вариантах осуществления к олигонуклеотидам ковалентно присоединены одна или несколько конъюгированных групп. В определенных вариантах осуществления конъюгированные группы модифицируют одно или несколько свойств олигонуклеотида, к которому они присоединены, в том числе без ограничения фармакодинамические характеристики, фармакокинетические характеристики, стабильность, связывание, всасывание, распределение в тканях, распределение в клетках, поглощение клетками, заряд и клиренс. В определенных вариантах осуществления конъюгированные группы придают новое свойство олигонуклеотиду, к которому они присоединены, например, флуорофоры или репортерные группы обеспечивают выявление олигонуклеотида.

Некоторые конъюгированные группы и конъюгированные компоненты были описаны ранее, например: холестеринный компонент (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), холевая кислота (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060), простой тиоэфир, например, гексил-S-тримитиол (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), тиохолестерин (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), алифатическая цепь, например, додекандиоловые или ундециловые остатки (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), фософлипид, например, дигексадецил-рац-глицерин или 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат триэтиламония (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), полиамин или цепь полиэтиленгликоля (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973) или адамантануксусная кислота, пальмитиловый компонент (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), октадециламиноновый или гексиламинокарбонилхлестеринный компонент (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, i, 923-937), токоферольная группа (Nishina et al., Molecular Therapy Nucleic Acids, 2015, 4, e220; doi:10.1038/mtna.2014.72 и Nishina et al., Molecular Therapy, 2008, 16, 734-740) или кластер GalNAc (например, WO2014/179620).

#### **1. Конъюгированные компоненты.**

Конъюгированные компоненты включают без ограничения интеркаляторы, репортерные молекулы,

полиамины, полиамиды, пептиды, углеводы (например, GalNAc), витаминные компоненты, полиэтиленгликоли, тиоэфиры, полиэфиры, холестерин, тиохолестерин, компоненты, представляющие собой холевую кислоту, фолат, липиды, фосфолипиды, биотин, феназин, фенантридин, антрахинон, адамантан, акридин, флуоресцеины, родамины, кумарины, флуорофоры и красители.

В определенных вариантах осуществления конъюгированный компонент содержит действующее лекарственное вещество, например, аспирин, варфарин, фенилбутазон, ибупрофен, супрофен, фенбуфен, кетопрофен, (S)-(+)-пранофен, карпрофен, дансилсаркозин, 2,3,5-трийодбензойную кислоту, финголимод, флуфенаминовую кислоту, фолиновую кислоту, бензотиадиазид, хлортиазид, диазепин, индометин, барбитурат, цефалоспорин, сульфамидное лекарственное средство, антидиабетическое средство, антибактериальное средство или антибиотик.

## 2. Конъюгирующие линкеры.

Конъюгированные компоненты присоединены к олигонуклеотидам с помощью конъюгирующих линкеров. В некоторых соединениях конъюгированная группа представляет собой одинарную химическую связь (т.е. конъюгированный компонент присоединен к олигонуклеотиду с помощью конъюгирующего линкера посредством одинарной связи). В определенных вариантах осуществления конъюгирующий линкер содержит цепочечную структуру, такую как гидрокарбильная цепь, или олигомер из повторяющихся звеньев, таких как этиленгликолевые, нуклеозидные или аминокислотные звенья.

В определенных вариантах осуществления конъюгирующий линкер содержит одну или несколько групп, выбранных из алкильной, amino, оксо, амидной, дисульфидной, полиэтиленгликолевой, эфирной, тиоэфирной и гидроксиламино. В определенных подобных вариантах осуществления конъюгирующий линкер содержит группы, выбранные из алкильной, amino-, оксо-, амидной и эфирной групп. В определенных вариантах осуществления конъюгирующий линкер содержит группы, выбранные из алкильной и амидной групп. В определенных вариантах осуществления конъюгирующий линкер содержит группы, выбранные из алкильной и эфирной групп. В определенных вариантах осуществления конъюгирующий линкер содержит по меньшей мере один фосфоросодержащий компонент. В определенных вариантах осуществления конъюгирующий линкер содержит по меньшей мере одну фосфатную группу. В определенных вариантах осуществления конъюгирующий линкер содержит по меньшей мере одну нейтральную связывающую группу.

В определенных вариантах осуществления конъюгирующие линкеры, в том числе описанные выше конъюгирующие линкеры, представляют собой бифункциональные связывающие компоненты, например, известные из уровня техники как применимые для присоединения конъюгированных групп к исходным соединениям, таким как олигонуклеотиды, предусмотренные в данном документе. Как правило, бифункциональный связывающий компонент содержит по меньшей мере две функциональные группы. Одна из функциональных групп выбрана для связывания с конкретным сайтом в соединении, а другая выбрана для связывания с конъюгированной группой. Примеры функциональных групп, используемых в бифункциональном связывающем компоненте, включают без ограничения электрофилы для вступления в реакцию с нуклеофильными группами и нуклеофилы для вступления в реакцию с электрофильными группами. В определенных вариантах осуществления бифункциональные связывающие компоненты содержат одну или несколько групп, выбранных из amino, гидроксила, карбоновой кислоты, тиола, алкила, алкенила и алкинила.

Примеры конъюгирующих линкеров включают без ограничения пирролидин, 8-амино-3,6-диоксаоктановую кислоту (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC) и 6-аминогексановую кислоту (АНЕХ или АНА). Другие конъюгирующие линкеры включают без ограничения замещенный или незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкил, замещенный или незамещенный C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-алкенил или замещенный или незамещенный C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-алкинил, где неограничивающий перечень предпочтительных замещающих групп включает гидроксил, amino, алкокси, карбокси, бензил, фенил, нитро, тиол, тиоалкокси, галоген, алкил, арил, алкенил и алкинил.

В определенных вариантах осуществления конъюгирующие линкеры содержат 1-10 линкерных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления такие линкерные нуклеозиды являются модифицированными нуклеозидами. В определенных вариантах осуществления такие линкерные нуклеозиды содержат модифицированный сахарный компонент. В определенных вариантах осуществления линкерные нуклеозиды являются немодифицированными. В определенных вариантах осуществления линкерные нуклеозиды содержат необязательно защищенное гетероциклическое основание, выбранное из пурина, замещенного пурина, пиримидина или замещенного пиримидина. В определенных вариантах осуществления расщепляемый компонент представляет собой нуклеозид, выбранный из урацила, тимина, цитозина, 4-N-бензоилцитозина, 5-метилцитозина, 4-N-бензоил-5-метилцитозина, аденина, 6-N-бензоиладенина, гуанина и 2-N-изобутирилгуанина. Как правило, желательно, чтобы линкерные нуклеозиды отщеплялись от соединения после того, как оно достигнет ткани-мишени. Соответственно, линкерные нуклеозиды, как правило, связаны друг с другом и с остальной частью соединения посредством расщепляемых связей. В определенных вариантах осуществления такие расщепляемые связи представляют собой фосфодиэфирные связи.

В данном документе линкерные нуклеозиды не считаются частью олигонуклеотида. Соответствен-

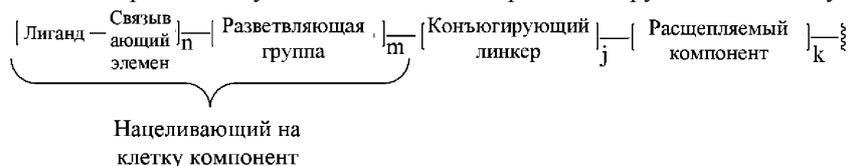
но, в вариантах осуществления, в которых соединение содержит олигонуклеотид, состоящий из связанных нуклеозидов в указанном количестве или диапазоне количеств и/или характеризующийся указанным процентом комплементарности по отношению к эталонной нуклеиновой кислоте, и соединение также содержит конъюгированную группу, содержащую конъюгирующий линкер, содержащий линкерные нуклеозиды, эти линкерные нуклеозиды не учитываются при определении длины олигонуклеотида и не используются при определении процента комплементарности олигонуклеотида по отношению к эталонной нуклеиновой кислоте. Например, соединение может содержать (1) модифицированный олигонуклеотид, состоящий из 8-30 нуклеозидов, и (2) конъюгированную группу, содержащую 1-10 линкерных нуклеозидов, смежных с нуклеозидами модифицированного олигонуклеотида. Общее количество смежных связанных нуклеозидов в таком соединении превышает 30. В качестве альтернативы, соединение может содержать модифицированный олигонуклеотид, состоящий из 8-30 нуклеозидов, и не содержать конъюгированную группу. Общее количество смежных связанных нуклеозидов в таком соединении не превышает 30. Если не указано иное, конъюгирующие линкеры содержат не более 10 линкерных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления конъюгирующие линкеры содержат не более 5 линкерных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления конъюгирующие линкеры содержат не более 2 линкерных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления конъюгирующие линкеры содержат не более 1 линкерного нуклеозида.

В определенных вариантах осуществления желательно, чтобы конъюгированная группа отщеплялась от олигонуклеотида. Например, при определенных обстоятельствах соединения, содержащие конкретный конъюгированный компонент, лучше поглощаются клетками конкретного типа, однако после поглощения соединения желательно, чтобы конъюгированная группа отщеплялась с высвобождением неконъюгированного или исходного олигонуклеотида. Таким образом, некоторые конъюгаты могут содержать один или несколько расщепляемых компонентов, как правило, в составе конъюгирующего линкера. В определенных вариантах осуществления расщепляемый компонент представляет собой расщепляемую связь. В определенных вариантах осуществления расщепляемый компонент представляет собой группу атомов, содержащую по меньшей мере одну расщепляемую связь. В определенных вариантах осуществления расщепляемый компонент содержит группу атомов, имеющую одну, две, три, четыре или более четырех расщепляемых связей. В определенных вариантах осуществления расщепляемый компонент избирательно расщепляется внутри клеточного или субклеточного компартмента, такого как лизосома. В определенных вариантах осуществления расщепляемый компонент избирательно расщепляется эндогенными ферментами, такими как нуклеазы.

В определенных вариантах осуществления расщепляемая связь выбрана из амидной, сложноэфирной, эфирной, одной или обеих сложноэфирных в фосфодиэфирной связи, фосфоэфирной, карбаматной или дисульфидной. В определенных вариантах осуществления расщепляемая связь является одной или обеими из сложноэфирных в фосфодиэфирной связи. В определенных вариантах осуществления расщепляемый компонент содержит фосфат или фосфодиэфир. В определенных вариантах осуществления расщепляемый компонент представляет собой фосфатную связь между олигонуклеотидом и конъюгированным компонентом или конъюгированной группой.

В определенных вариантах осуществления расщепляемый компонент содержит один или несколько линкерных нуклеозидов или состоит из них. В определенных подобных вариантах осуществления один или несколько линкерных нуклеозидов связаны друг с другом и/или с остальной частью соединения посредством расщепляемых связей. В определенных вариантах осуществления такие расщепляемые связи представляют собой немодифицированные фосфодиэфирные связи. В определенных вариантах осуществления расщепляемый компонент представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, который присоединен к 3'-либо к 5'-концевому нуклеозиду олигонуклеотида посредством фосфатной межнуклеозидной связи и ковалентно присоединен к остальной части конъюгирующего линкера или конъюгированному компоненту посредством фосфатной или фосфотиоатной связи. В определенных подобных вариантах осуществления расщепляемый компонент представляет собой 2'-дезоксиаденозин.

3. Некоторые конъюгированные компоненты, нацеливающие на клетку В определенных вариантах осуществления конъюгированная группа содержит конъюгированный компонент, нацеливающий на клетку. В определенных вариантах осуществления конъюгированная группа имеет общую формулу:



где n равняется от 1 до приблизительно 3, m равняется 0, если n равняется 1, m равняется 1, если n равняется 2 или более, j равняется 1 или 0, и k равняется 1 или 0.

В определенных вариантах осуществления n равняется 1, j равняется 1, и k равняется 0. В определенных вариантах осуществления n равняется 1, j равняется 0, и k равняется 1. В определенных вариантах

тах осуществления  $n$  равняется 1,  $j$  равняется 1, и  $k$  равняется 1. В определенных вариантах осуществления  $n$  равняется 2,  $j$  равняется 1, и  $k$  равняется 0. В определенных вариантах осуществления  $n$  равняется 2,  $j$  равняется 0, и  $k$  равняется 1. В определенных вариантах осуществления  $n$  равняется 2,  $j$  равняется 1, и  $k$  равняется 1. В определенных вариантах осуществления  $n$  равняется 3,  $j$  равняется 1, и  $k$  равняется 0. В определенных вариантах осуществления  $n$  равняется 3,  $j$  равняется 0, и  $k$  равняется 1. В определенных вариантах осуществления  $n$  равняется 3,  $j$  равняется 1, и  $k$  равняется 1.

В определенных вариантах осуществления конъюгированные группы содержат компоненты, нацеливающие на клетку, которые имеют по меньшей мере один связанный лиганд. В определенных вариантах осуществления компоненты, нацеливающие на клетку, содержат два связанных лиганда, ковалентно присоединенных к разветвляющейся группе. В определенных вариантах осуществления компоненты, нацеливающие на клетку, содержат три связанных лиганда, ковалентно присоединенных к разветвляющейся группе.

В определенных вариантах осуществления компонент, нацеливающий на клетку, содержит разветвляющуюся группу, содержащую одну или несколько групп, выбранных из алкильной, amino-, оксо-, амидной, дисульфидной, полиэтиленгликолевой, эфирной, тиоэфирной и гидроксиламиногруппы. В определенных вариантах осуществления разветвляющаяся группа содержит разветвленную алифатическую группу, содержащую группы, выбранные из алкильной, amino-, оксо-, амидной, дисульфидной, полиэтиленгликолевой, эфирной, тиоэфирной и гидроксиламиногруппы. В определенных подобных вариантах осуществления разветвленная алифатическая группа содержит группы, выбранные из алкильной, amino-, оксо-, амидной и эфирной группы. В определенных подобных вариантах осуществления разветвленная алифатическая группа содержит группы, выбранные из алкильной, amino- и эфирной группы. В определенных подобных вариантах осуществления разветвленная алифатическая группа содержит группы, выбранные из алкильной и эфирной группы. В определенных вариантах осуществления разветвляющаяся группа содержит моно- или полициклическую кольцевую систему.

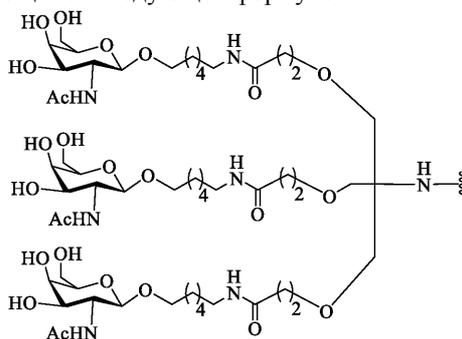
В определенных вариантах осуществления каждый связывающий элемент компонента, нацеливающего на клетку, содержит одну или несколько групп, выбранных из алкильной, замещенной алкильной, эфирной, тиоэфирной, дисульфидной, amino-, оксо-, амидной, фосфодиэфирной и полиэтиленгликолевой в любой комбинации. В определенных вариантах осуществления каждый связывающий элемент представляет собой линейную алифатическую группу, содержащую одну или несколько групп, выбранных из алкильной, эфирной, тиоэфирной, дисульфидной, amino-, оксо-, амидной и полиэтиленгликолевой в любой комбинации. В определенных вариантах осуществления каждый связывающий элемент представляет собой линейную алифатическую группу, содержащую одну или несколько групп, выбранных из алкильной, фосфодиэфирной, эфирной, amino-, оксо- и амидной в любой комбинации. В определенных вариантах осуществления каждый связывающий элемент представляет собой линейную алифатическую группу, содержащую одну или несколько групп, выбранных из алкильной, эфирной, amino-, оксо- и амидной в любой комбинации. В определенных вариантах осуществления каждый связывающий элемент представляет собой линейную алифатическую группу, содержащую одну или несколько групп, выбранных из алкильной и оксо- в любой комбинации. В определенных вариантах осуществления каждый связывающий элемент представляет собой линейную алифатическую группу, содержащую одну или несколько групп, выбранных из алкильной и оксо- в любой комбинации. В определенных вариантах осуществления каждый связывающий элемент представляет собой линейную алифатическую группу, содержащую одну или несколько групп, выбранных из алкильной и фосфодиэфирной в любой комбинации. В определенных вариантах осуществления каждый связывающий элемент содержит по меньшей мере одну фосфорсодержащую связывающую группу или нейтральную связывающую группу. В определенных вариантах осуществления каждый связывающий элемент содержит цепь длиной от приблизительно 6 до приблизительно 20 атомов. В определенных вариантах осуществления каждый связывающий элемент содержит цепь длиной от приблизительно 10 до приблизительно 18 атомов. В определенных вариантах осуществления каждый связывающий элемент содержит цепь длиной приблизительно 10 атомов.

В определенных вариантах осуществления каждый лиганд компонента, нацеливающего на клетку, характеризуется сродством к рецепторам по меньшей мере одного типа на клетке-мишени. В определенных вариантах осуществления каждый лиганд характеризуется сродством к рецепторам по меньшей мере одного типа на поверхности клетки печени млекопитающего. В определенных вариантах осуществления каждый лиганд характеризуется сродством к асиалогликопротеиновому рецептору печени (ASGP-R). В определенных вариантах осуществления каждый лиганд представляет собой углевод. В определенных вариантах осуществления каждый лиганд независимо выбран из галактозы, N-ацетилгалактозамина (GalNAc), маннозы, глюкозы, глюкозамина и фукозы. В определенных вариантах осуществления каждый лиганд представляет собой N-ацетилгалактозамин (GalNAc). В определенных вариантах осуществления компонент, нацеливающий на клетку, содержит 3 GalNAc-лиганда. В определенных вариантах осуществления компонент, нацеливающий на клетку, содержит 2 GalNAc-лиганда. В определенных вариантах осуществления компонент, нацеливающий на клетку, содержит 1 GalNAc-лиганд.

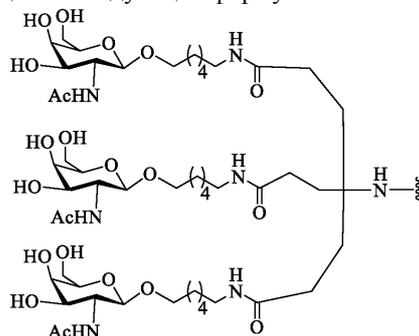
В определенных вариантах осуществления каждый лиганд компонента, нацеливающего на клетку, представляет собой углевод, производное углевода, модифицированный углевод, полисахарид, модифи-

цированный полисахарид или производное полисахарида. В определенных подобных вариантах осуществления конъюгированная группа содержит углеводный кластер (см., например, Maier et al., "Synthesis of Antisense Oligonucleotides Conjugated to a Multivalent Carbohydrate Cluster for Cellular Targeting", *Bioconjugate Chemistry*, 2003, 14, 18-29, или Rensen et al., "Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor", *J. Med. Chem.* 2004, 47, 5798-5808, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В определенных подобных вариантах осуществления каждый лиганд представляет собой аминсахар или тиосахар. Например, аминсахара могут быть выбраны из любого количества соединений, известных из уровня техники, таких как сиаловая кислота,  $\alpha$ -D-галактозамин,  $\beta$ -мурамовая кислота, 2-дезоксид-2-метиламино-L-глюкопираноза, 4,6-дидезокси-4-формамидо-2,3-ди-O-метил-D-маннопираноза, 2-дезоксид-2-сульфоамино-D-глюкопираноза, и N-сульфо-D-глюкозамин, и N-гликолоил- $\alpha$ -нейраминная кислота. Например, тиосахара могут быть выбраны из 5-тио- $\beta$ -D-глюкопиранозы, метил-2,3,4-три-O-ацетил-1-тио-6-O-тримил- $\alpha$ -D-глюкопиранозида, 4-тио- $\beta$ -D-галактопиранозы и этил-3,4,6,7-тетра-O-ацетил-2-дезоксид-1,5-дитио- $\alpha$ -D-глюкогептопиранозида.

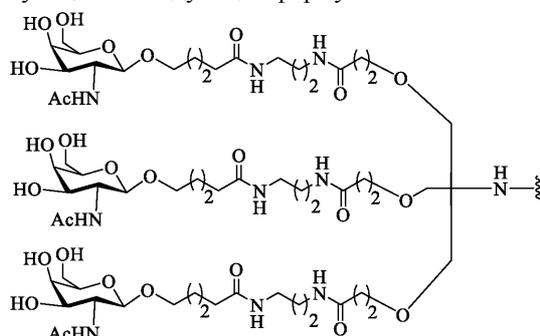
В определенных вариантах осуществления конъюгированные группы содержат компонент, нацеливающий на клетку, характеризующийся следующей формулой:



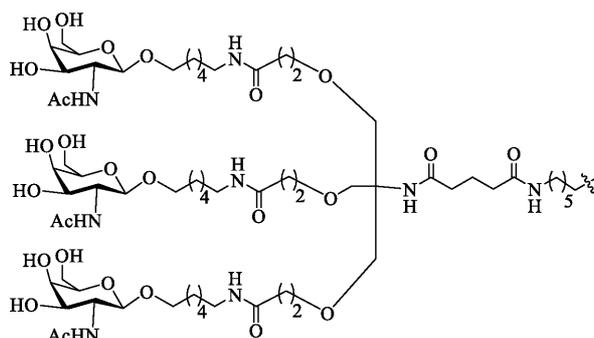
В определенных вариантах осуществления конъюгированные группы содержат компонент, нацеливающий на клетку, характеризующийся следующей формулой:



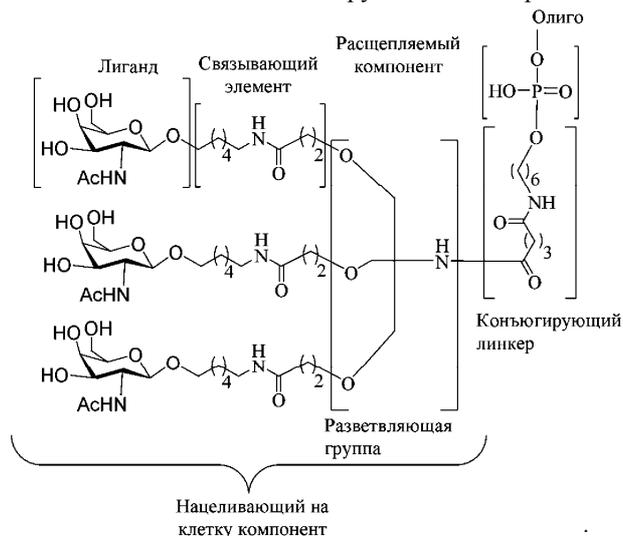
В определенных вариантах осуществления конъюгированные группы содержат компонент, нацеливающий на клетку, характеризующийся следующей формулой:



В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат конъюгированную группу, описанную в данном документе как "LICA-1". LICA-1 показана ниже без обязательного расщепляемого компонента на конце конъюгирующего линкера:



В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат LICA-1 и расщепляемый компонент в составе конъюгирующего линкера и имеют следующую формулу:



где олиго представляет собой олигонуклеотид.

Иллюстративные публикации, в которых изложено получение некоторых из вышеупомянутых конъюгированных групп и соединений, содержащих конъюгированные группы, связывающие элементы, конъюгирующие линкеры, разветвляющиеся группы, лиганды, расщепляемые компоненты, а также другие модификации, включают без ограничения US 5994517, US 6300319, US 6660720, US 6906182, US 7262177, US 7491805, US 8106022, US 7723509, US 9127276, US 2006/0148740, US 2011/0123520, WO 2013/033230 и WO 2012/037254, Biessen et al., *J. Med. Chem.* 1995, 38, 1846-1852, Lee et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2011, 19, 2494-2500, Rensen et al., *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 37577-37584, Rensen et al., *J. Med. Chem.* 2004, 47, 5798-5808, Sliedregt et al., *J. Med. Chem.* 1999, 42, 609-618, и Valentijn et al., *Tetrahedron*, 1997, 53, 759-770, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат модифицированные олигонуклеотиды, содержащие гэтмерный или полностью модифицированный мотив, и конъюгированную группу, содержащую по меньшей мере один, два или три GalNAc-лиганда. В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат конъюгированную группу, которую можно найти в любом из следующих литературных источников: Lee, *Carbohydr Res*, 1978, 67, 509-514; Connolly et al., *J Biol Chem*, 1982, 257, 939-945; Pavia et al., *Int J Pep Protein Res*, 1983, 22, 539-548; Lee et al., *Biochem*, 1984, 23, 4255-4261; Lee et al., *Glycoconjugate J*, 1987, 4, 317-328; Toyokuni et al., *Tetrahedron Lett*, 1990, 31, 2673-2676; Biessen et al., *J Med Chem*, 1995, 38, 1538-1546; Valentijn et al., *Tetrahedron*, 1997, 53, 759-770; Kim et al., *Tetrahedron Lett*, 1997, 38, 3487-3490; Lee et al., *Bioconjug Chem*, 1997, 8, 762-765; Kato et al., *Glycobiol*, 2001, 11, 821-829; Rensen et al., *J Biol Chem*, 2001, 276, 37577-37584; Lee et al., *Methods Enzymol*, 2003, 362, 38-43; Westerlind et al., *Glycoconj J*, 2004, 21, 227-241; Lee et al., *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16(19), 5132-5135; Maierhofer et al., *Bioorg Med Chem*, 2007, 15, 7661-7676; Khorev et al., *Bioorg Med Chem*, 2008, 16, 5216-5231; Lee et al., *Bioorg Med Chem*, 2011, 19, 2494-2500; Kornilova et al., *Analyt Biochem*, 2012, 425, 43-46; Pujol et al., *Angew Chemie Int Ed Engl*, 2012, 51, 7445-7448; Biessen et al., *J Med Chem*, 1995, 38, 1846-1852; Sliedregt et al., *J Med Chem*, 1999, 42, 609-618; Rensen et al., *J Med Chem*, 2004, 47, 5798-5808; Rensen et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26, 169-175; van Rossenberg et al., *Gene Ther*, 2004, 11, 457-464; Sato et al., *J Am Chem Soc*, 2004, 126, 14013-14022; Lee et al., *J Org Chem*, 2012, 77, 7564-7571; Biessen et al., *FASEB J*, 2000, 14, 1784-1792; Rajur et al., *Bioconjug Chem*, 1997, 8, 935-940; Duff et al., *Methods Enzymol*, 2000, 313, 297-321; Maier et al., *Bioconjug Chem*, 2003, 14, 18-29; Jayaprakash et al., *Org Lett*, 2010, 12, 5410-5413; Manoharan, An-

tisense Nucleic Acid Drug Dev, 2002, 12, 103-128; Merwin et al., Bioconjug Chem, 1994, 5, 612-620; Tomiya et al., Bioorg Med Chem, 2013, 21, 5275-5281; международных публикациях WO1998/013381; WO2011/038356; WO1997/046098; WO2008/098788; WO2004/101619; WO2012/037254; WO2011/120053; WO2011/100131; WO2011/163121; WO2012/177947; WO2013/033230; WO2013/075035; WO2012/083185; WO2012/083046; WO2009/082607; WO2009/134487; WO2010/144740; WO2010/148013; WO1997/020563; WO2010/088537; WO2002/043771; WO2010/129709; WO2012/068187; WO2009/126933; WO2004/024757; WO2010/054406; WO2012/089352; WO2012/089602; WO2013/166121; WO2013/165816; патентах США 4751219; 8552163; 6908903; 7262177; 5994517; 6300319; 8106022; 7491805; 7491805; 7582744; 8137695; 6383812; 6525031; 6660720; 7723509; 8541548; 8344125; 8313772; 8349308; 8450467; 8501930; 8158601; 7262177; 6906182; 6620916; 8435491; 8404862; 7851615; публикациях заявок на патент США US2011/0097264; US2011/0097265; US2013/0004427; US2005/0164235; US2006/0148740; US2008/0281044; US2010/0240730; US2003/0119724; US2006/0183886; US2008/0206869; US2011/0269814; US2009/0286973; US2011/0207799; US2012/0136042; US2012/0165393; US2008/0281041; US2009/0203135; US2012/0035115; US2012/0095075; US2012/0101148; US2012/0128760; US2012/0157509; US2012/0230938; US2013/0109817; US2013/0121954; US2013/0178512; US2013/0236968; US2011/0123520; US2003/0077829; US2008/0108801 и US2009/0203132; каждый из которых включен посредством ссылки во всей своей полноте.

Композиции и способы составления фармацевтических композиций.

Соединения, описанные в данном документе, можно смешивать с фармацевтически приемлемыми активными или инертными веществами для получения фармацевтических композиций или составов. Композиции и способы составления фармацевтических композиций зависят от ряда критериев, в том числе без ограничения от пути введения или степени заболевания.

В определенных вариантах осуществления предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие одно или несколько соединений или их соль. В определенных вариантах осуществления соединения представляют собой бессмысловые соединения или олигомерные соединения. В определенных вариантах осуществления соединения содержат модифицированный олигонуклеотид или состоят из него. В определенных подобных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит подходящий фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит стерильный солевой раствор и одно или несколько соединений. В определенных вариантах осуществления такая фармацевтическая композиция состоит из стерильного солевого раствора и одного или нескольких соединений. В определенных вариантах осуществления стерильный солевой раствор представляет собой солевой раствор фармацевтической степени чистоты. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит одно или несколько соединений и стерильную воду. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция состоит из одного соединения и стерильной воды. В определенных вариантах осуществления стерильная вода представляет собой воду фармацевтической степени чистоты. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит одно или несколько соединений и фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция состоит из одного соединения и стерильного PBS. В определенных вариантах осуществления стерильный PBS представляет собой PBS фармацевтической степени чистоты. Композиции и способы составления фармацевтических композиций зависят от ряда критериев, в том числе без ограничения от пути введения или степени заболевания.

Соединение, описанное в данном документе, нацеливающееся на нуклеиновую кислоту PCSK9, можно применять в фармацевтических композициях путем объединения соединения с подходящим фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем. В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемый разбавитель представляет собой воду, такую как стерильная вода, подходящая для инъекций. Соответственно, в одном варианте осуществления, в описанных в данном документе способах используют фармацевтическую композицию, содержащую соединение, нацеливающееся на нуклеиновую кислоту PCSK9, и фармацевтически приемлемый разбавитель. В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемый разбавитель представляет собой воду. В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, предусмотренный в данном документе, или состоит из него.

Фармацевтические композиции, содержащие соединения, предусмотренные в данном документе, охватывают любые фармацевтически приемлемые соли, сложные эфиры или соли таких сложных эфиров или любой другой олигонуклеотид, которые при введении животному, в том числе человеку, способны предоставить ему (непосредственно или опосредованно) их биологически активный метаболит или остаток. В определенных вариантах осуществления соединения представляют собой бессмысловые соединения или олигомерные соединения. В определенных вариантах осуществления соединения содержат модифицированный олигонуклеотид или состоят из него. Соответственно, например, настоящее изобретение также охватывает фармацевтически приемлемые соли соединений, пролекарства, фармацевтически приемлемые соли таких пролекарств и другие биоэквиваленты. Подходящие фармацевтически приемлемые соли включают без ограничения натриевые и калиевые соли.

Пролекарство может предусматривать включение дополнительных нуклеозидов на одном или обо-

их концах соединения, которые отщепляются под действием эндогенных нуклеаз в организме с образованием активного соединения.

В определенных вариантах осуществления соединения или композиции дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Некоторые отобранные соединения.

У примерно 1540 новых сконструированных соединений и нескольких ранее раскрытых соединений с различными длиной, химическими структурами и мотивами тестировали их эффект в отношении mRNA PCSK9 человека *in vitro* в нескольких типах клеток (примеры 1-2). Из 1540 соединений, тестируемых в отношении эффективности в однократной дозе *in vitro*, 183 отобранных соединения тестировали в отношении дозозависимого подавления в клетках HepG2 (пример 2). Из 183 соединений, тестируемых в анализах зависимости ответа от дозы, 134 олигонуклеотида были отобраны для исследования переносимости однократной дозы *in vivo* у грызунов. Эти 134 олигонуклеотида конъюгировали на 3'-конце с концевой кэп-структурой ТНА-С6-GalNAc3-(3R,5S)-5-(гидроксиметил)пирролидин-3-олфосфатом (в дальнейшем называемой 3'-ТНА).

В модели переносимости однократной дозы у грызунов мышам BALB/c вводили дозу 3'-ТНА-олигонуклеотида в высокой концентрации и измеряли уровни маркеров функции печени, таких как аланин-трансаминаза и аспартат-трансаминаза (пример 3). ISIS 863413 (SEQ ID NO: 1096), ISIS 863419 (SEQ ID NO: 1419), ISIS 863424 (SEQ ID NO: 1297), ISIS 863425 (SEQ ID NO: 1528), ISIS 863427 (SEQ ID NO: 1145), ISIS 863433 (SEQ ID NO: 1223), ISIS 863434 (SEQ ID NO: 377), ISIS 863436 (SEQ ID NO: 763), ISIS 863437 (SEQ ID NO: 994), ISIS 863438 (SEQ ID NO: 1071), ISIS 863439 (SEQ ID NO: 1147), ISIS 863441 (SEQ ID NO: 1302), ISIS 863444 (SEQ ID NO: 1149), ISIS 863445 (SEQ ID NO: 455), ISIS 863448 (SEQ ID NO: 1380), ISIS 863452 (SEQ ID NO: 691), ISIS 863472 (SEQ ID NO: 926), ISIS 863473 (SEQ ID NO: 1233), ISIS 863474 (SEQ ID NO: 619), ISIS 863475 (SEQ ID NO: 388), ISIS 863477 (SEQ ID NO: 1542), ISIS 863479 (SEQ ID NO: 1158), ISIS 863480 (SEQ ID NO: 1235), ISIS 863481 (SEQ ID NO: 389), ISIS 863482 (SEQ ID NO: 1312), ISIS 863483 (SEQ ID NO: 1240), ISIS 863484 (SEQ ID NO: 549), ISIS 863485 (SEQ ID NO: 550), ISIS 863486 (SEQ ID NO: 781), ISIS 863489 (SEQ ID NO: 939), ISIS 863490 (SEQ ID NO: 1016), ISIS 863491 (SEQ ID NO: 1243), ISIS 863493 (SEQ ID NO: 629), ISIS 863494 (SEQ ID NO: 1017), ISIS 863495 (SEQ ID NO: 1092), ISIS 863496 (SEQ ID NO: 1244), ISIS 863497 (SEQ ID NO: 554), ISIS 863498 (SEQ ID NO: 478), ISIS 863499 (SEQ ID NO: 1094), ISIS 863502 (SEQ ID NO: 563), ISIS 863506 (SEQ ID NO: 410), ISIS 863507 (SEQ ID NO: 1411), ISIS 863509 (SEQ ID NO: 721), ISIS 863510 (SEQ ID NO: 1258), ISIS 863511 (SEQ ID NO: 645), ISIS 863512 (SEQ ID NO: 955), ISIS 863514 (SEQ ID NO: 1413), ISIS 863516 (SEQ ID NO: 881), ISIS 863517 (SEQ ID NO: 648), ISIS 863518 (SEQ ID NO: 725), ISIS 863520 (SEQ ID NO: 1111), ISIS 863522 (SEQ ID NO: 1188), ISIS 863524 (SEQ ID NO: 885), ISIS 863525 (SEQ ID NO: 504), ISIS 863526 (SEQ ID NO: 1043), ISIS 863527 (SEQ ID NO: 1195), ISIS 863531 (SEQ ID NO: 426), ISIS 863533 (SEQ ID NO: 427), ISIS 863536 (SEQ ID NO: 585), ISIS 863537 (SEQ ID NO: 1047), ISIS 863538 (SEQ ID NO: 353), ISIS 863539 (SEQ ID NO: 1352), ISIS 863541 (SEQ ID NO: 1203), ISIS 863545 (SEQ ID NO: 1516), ISIS 863547 (SEQ ID NO: 1213), ISIS 863548 (SEQ ID NO: 367), ISIS 863549 (SEQ ID NO: 1061), ISIS 863550 (SEQ ID NO: 523), ISIS 863552 (SEQ ID NO: 831) и ISIS 863553 (SEQ ID NO: 908) считались переносимыми в данном исследовании и были отобраны для дальнейшей оценки в модели на трансгенных мышах.

В модели переносимости на мышах, трансгенных по PCSK9, мышам вводили дозу олигонуклеотидов, конъюгированных с 3'-ТНА, и измеряли уровни аланин-трансаминазы, аспартат-трансаминазы, холестерина, холестерина HDL, холестерина LDL и триглицеридов в плазме крови (пример 4). Было обнаружено, что ISIS 863433, ISIS 863490, ISIS 863512, ISIS 863527, ISIS 863538, ISIS 863425, ISIS 863438, ISIS 863439, ISIS 863444, ISIS 863413, ISIS 863434, ISIS 863436, ISIS 863494 и ISIS 863539 являются переносимыми. Отобранные олигонуклеотидные последовательности конъюгировали на 5'-конце с концевой кэп-структурой трисгексиламино-(ТНА)-С6GalNAc3 (в дальнейшем называемой 5'-ТНА) и тестировали в модели на мышах CD-1. Олигонуклеотиды, конъюгированные с 5'-ТНА, представляют собой ISIS 845219, ISIS 863568, ISIS 863576, ISIS 863577, ISIS 863579, ISIS 863581, ISIS 863582, ISIS 863587, ISIS 863633, ISIS 863637, ISIS 863655, ISIS 863670, ISIS 863681 и ISIS 863682.

В модели переносимости на мышах CD-1 мышам в течение шести недель вводили различные дозы антисмыслового олигонуклеотида и измеряли маркеры переносимости, такие как маркеры функции печени и почек (уровни ALT, AST, альбумина, BUN, креатинина и билирубина в плазме крови), гематологические маркеры (число клеток крови для RBC, WBC, тромбоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов, а также уровень гемоглобина, гематокрит и величину MCV), а также показатели массы тела и органов (пример 5). Для дальнейшей оценки в крысиной модели отбирали только те олигонуклеотиды, при обработке которыми в плазме крови достигались уровни этих маркеров, находившиеся в пределах ожидаемого диапазона после обработки антисмысловыми олигонуклеотидами. ISIS 863568, ISIS 863576, ISIS 863579, ISIS 863581, ISIS 863582, ISIS 863587, ISIS 863633, ISIS 863655, ISIS 863670 и ISIS 863681 были отобраны для дальнейшего исследования в крысиной модели.

В модели на крысах Спрег-Дуоли крысам аналогичным образом в течение 6 недель вводили дозы антисмысловых олигонуклеотидов и измеряли маркеры переносимости, такие как маркеры функции пе-

чени (уровни ALT, AST, альбумина, BUN, креатинина и билирубина в плазме крови), маркеры функции почек (уровни креатинина и общего белка в моче), а также еженедельные показатели массы тела и конечные показатели массы органов (пример 6).

Эти олигонуклеотиды также тестировали в отношении их вязкости (пример 8), и было обнаружено, что все из них обладали оптимальной вязкостью в соответствии с критериями тестирования.

ISIS 863568, ISIS 863579, ISIS 863581, ISIS 863582, ISIS 863587, ISIS 863633, ISIS 863655, ISIS 863670 и ISIS 863681 тестировали в отношении эффективности в четырехнедельном исследовании зависимости от дозы в модели на мышах, трансгенных по PCSK9 (пример 7). По окончании 4 недель печень мышей анализировали в отношении уровней экспрессии mRNA PCSK9 и рассчитывали ED<sub>50</sub>. Кроме того, измеряли уровни белка PCSK9 в плазме крови, уровни холестерина LDL в плазме крови и уровни рецепторов LDL в печени. Наблюдала, что обработка антисмысловыми олигонуклеотидами приводила к подавлению уровней экспрессии mRNA PCSK9 в печени, снижению уровней холестерина LDL в плазме крови и соответствующему увеличению уровней рецепторов LDL в печени. В частности, было обнаружено, что обработка с помощью ISIS 863633 являлась эффективной.

ISIS 863568, ISIS 863579, ISIS 863581, ISIS 863582, ISIS 863587, ISIS 863633, ISIS 863655, ISIS 863670 и ISIS 863681 тестировали в отношении активности, фармакокинетического профиля и переносимости в 12-недельном исследовании на макаках-крабоедах (пример 9). Обработка соединениями, которые в полной мере перекрестно реагировали с последовательностью гена макака-резуса, вызывала снижение экспрессии mRNA PCSK9 в ткани печени. В частности, обработка с помощью ISIS 863633, ISIS 863670 и ISIS 863681 вызывала снижение экспрессии mRNA PCSK9 в ткани печени по сравнению с контролем PBS. Было отмечено, что ISIS 863633 вызывал наибольшее снижение экспрессии mRNA PCSK9 по сравнению с контролем PBS. Изменения уровней белка PCSK9, уровней холестерина LDL, уровней общего холестерина и уровней рецепторов LDL в печени является следствием подавления уровней mRNA PCSK9. Обработка с помощью ISIS 863633, ISIS 863670 и ISIS 863681 вызывала снижение уровней белка PCSK9, уровней холестерина LDL, уровней общего холестерина и индуцирование уровней рецепторов LDL в печени, при этом ISIS 863633 вызывал наиболее значительное изменение. Обработка с помощью антисмысловых олигонуклеотидов не вызывала каких-либо изменений уровней холестерина HDL или триглицеридов. Следовательно, с точки зрения активности ISIS 863633 был наиболее эффективным в исследовании на обезьянах. Обезьяны хорошо переносили обработку с помощью соединений, в частности, обработку с помощью ISIS 863633.

Новые соединения сравнивали с ранее сконструированными соединениями, в том числе ISIS 405879 и ISIS 405995, которые были ранее определены как одни из наиболее эффективных антисмысловых соединений *in vitro* (см., например, патент США 8084437), а также ISIS 431131 и ISIS 480604, которые были ранее описаны в патенте США 9127276 (пример 10). Прямое сравнительное исследование продемонстрировало, что ISIS 863568, ISIS 863579, ISIS 863581, ISIS 863582, ISIS 863587, ISIS 863633, ISIS 863655, ISIS 863670 и ISIS 863681 были более эффективными, чем любой из ранее публично раскрытых олигонуклеотидов.

Соответственно, в данном документе предусмотрены соединения с любыми одним или несколькими улучшенными свойствами. В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, являются эффективными и переносимыми.

### Примеры

В приведенных ниже примерах описан способ скрининга для идентификации лидерных соединений, нацеливающихся на PCSK9. Из более чем 1540 антисмысловых олигонуклеотидов, которые были подвергнуты скринингу, ISIS 863568, ISIS 863579, ISIS 863581, ISIS 863582, ISIS 863587, ISIS 863633, ISIS 863655, ISIS 863670 и ISIS 863681 оказались наилучшими лидерными соединениями. В частности, ISIS 863633 проявлял наилучшую комбинацию свойств с точки зрения эффективности и переносимости из более 1540 олигонуклеотидов.

Неограничивающее раскрытие и включение посредством ссылки.

Несмотря на то что в перечне последовательностей, прилагаемом к данной подаваемой заявке, каждая последовательность в соответствии с установленными требованиями идентифицирована как "РНК" либо как "ДНК", в действительности эти последовательности могут быть модифицированы с помощью любой комбинации химических модификаций. Специалист в данной области легко поймет, что такое обозначение, как "РНК" или "ДНК", для описания модифицированных олигонуклеотидов, в некоторых случаях является произвольным. Например, олигонуклеотид, содержащий нуклеозид, содержащий 2'-ОН-сахарный компонент и тиминовое основание, может быть описан как ДНК, имеющая модифицированный сахар (2'-ОН вместо природного 2'-Н в ДНК), или как РНК, имеющая модифицированное основание (тимин (метилированный урацил) вместо природного урацила в РНК). В данном документе предусмотрено, что обозначение "О" в анализах подавления mRNA указывает лишь на то, что антисмысловый олигонуклеотид не подавляет уровни экспрессии mRNA.

Соответственно, предложенные здесь последовательности нуклеиновых кислот, в том числе, но не ограничиваясь приведенными в перечне последовательностями, предназначены охватывать нуклеиновые кислоты, содержащие любую комбинацию из природных или модифицированных РНК и/или ДНК,

включая, но не ограничиваясь такими нуклеиновыми кислотами с модифицированными нуклеиновыми основаниями. В качестве дополнительного примера и без ограничения, олигонуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновых оснований "ATCGATCG", охватывает любые олигонуклеотиды, имеющие такую последовательность нуклеиновых оснований, независимо от того, являются ли они модифицированными или немодифицированными, в том числе без ограничения такие соединения, которые содержат основания РНК, такие как соединения, имеющие последовательность "AUCGAUCG", и соединения, имеющие несколько оснований ДНК и несколько оснований РНК, такие как "AUCGATCG", а также соединения, имеющие другие модифицированные нуклеиновые основания, такие как "AT<sup>m</sup>CGAUCG", где <sup>m</sup>С указывает на цитозиновое основание, содержащее метильную группу в 5-положении.

Хотя некоторые описанные в данном документе соединения, композиции и способы были конкретно описаны в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, нижеследующие примеры служат только для иллюстрации соединений, описанных в данном документе, и не подразумевают их ограничение. Каждая из ссылок, упомянутая в настоящей заявке, включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Пример 1. Антисмысловое подавление PCSK9 человека в клетках HepG2 с помощью сEt-гэпмеров 3-10-3.

Антисмысловые олигонуклеотиды конструировали для нацеливания на нуклеиновую кислоту PCSK9 и тестировали их эффекты в отношении mRNA PCSK9 *in vitro*. Химерные антисмысловые олигонуклеотиды в приведенных ниже таблицах обозначены как сEt-гэпмеры 3-10-3. Гэпмеры имеют длину 16 нуклеозидов, при этом центральный гэп-сегмент содержит десять 2'-дезоксинуклеозидов и фланкирован фланговыми сегментами на 5'-конце и на 3'-конце, каждый из которых содержит три нуклеозида. Каждый нуклеозид в 5'-концевом фланговом сегменте и каждый нуклеозид в 3'-концевом фланговом сегменте имеет сEt-модификацию сахара. Все межнуклеозидные связи в каждом гэпмере являются фосфотиоатными (P=S) связями. Все цитозиновые остатки в каждом гэпмере представляют собой 5-метилцитозин.

"Стартовый сайт" указывает на самый крайний 5'-концевой нуклеозид, на который нацеливается гэпмер, в последовательности гена человека. "Стоп-сайт" указывает на самый крайний 3'-концевой нуклеозид, на который нацеливается гэпмер, в последовательности гена человека. Каждый гэпмер, перечисленный в приведенных ниже таблицах, нацеливается на mRNA PCSK9 человека, обозначенную в данном документе как SEQ ID NO: 1 (№ доступа в GENBANK NM\_174936.3), либо на геномную последовательность PCSK9 человека, обозначенную в данном документе как SEQ ID NO: 2 (№ доступа в GENBANK NC\_000001.11 с отсеченными нуклеотидами 55036001-55068000). "n/a" указывает на то, что антисмысловый олигонуклеотид не нацеливается на такую конкретную последовательность гена со 100% комплементарностью.

Антисмысловые олигонуклеотиды тестировали в серии экспериментов, в которых были сходные условия культивирования. Результаты каждого эксперимента представлены в показанных ниже отдельных таблицах.

#### Исследование 1.

Культивируемые клетки HepG2 при плотности 20000 клеток на лунку трансфицировали путем электропорации с помощью 1000 нМ антисмыслового олигонуклеотида. ISIS 431131, ранее раскрытый в WO2014179620, также был включен в исследование в качестве олигонуклеотида для сопоставления. После периода обработки, составлявшего примерно 24 ч, РНК выделяли из клеток и измеряли уровни mRNA PCSK9 с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Для измерения уровней mRNA использовали набор праймеров и зондов для PCSK9 человека от ABI (ID № Hs03037355\_m1). Уровни mRNA PCSK9 корректировали в соответствии с общим содержанием РНК, измеренным с помощью RIBOGREEN®. Результаты представлены в виде процента подавления PCSK9 по сравнению с необработанными контрольными клетками. Некоторые из новых сконструированных олигонуклеотидов были более эффективными, чем ранее раскрытый олигонуклеотид ISIS 431131.

Таблица 1  
 Подавление mRNA PCSK9 с помощью сЕт-гэпмеров 3-10-3,  
 нацеливающихся на SEQ ID NO: 1 и 2

№ ISIS	SEQ ID: 1, стартовый сайт	SEQ ID: 1, стоп-сайт	Последовательность	% подавления	SEQ ID: 2, стартовый сайт	SEQ ID 2: стоп-сайт	SEQ ID NO
431131	1015	1034	GTCACACTTGCTGG CCTGTC	3	N/A	N/A	3
859373	N/A	N/A	TCTGCCGTCCTTCC CA	36	4562	4577	4
859377	N/A	N/A	AGCATCTGCCGTCC TT	62	4566	4581	5
859381	N/A	N/A	TGTCAAGCACCCAC AGC	31	5010	5025	6
859385	N/A	N/A	TGACTTGTC AAGCA CC	61	5015	5030	7
859389	N/A	N/A	ATAAGTGA CT TGTC AA	45	5020	5035	8
859393	N/A	N/A	GCATTGTAAGTTCA CT	84	5138	5153	9
859397	N/A	N/A	GCTTGCATTGTAAG TT	29	5142	5157	10
859401	N/A	N/A	GGTTTTCC CAGCTC TG	85	5897	5912	11
859405	N/A	N/A	CTCTGGTTTTCCCA GC	72	5901	5916	12
859409	N/A	N/A	CCACCTCTGGTTTT CC	67	5905	5920	13
859413	N/A	N/A	GTCTGCTCCA ACTG CT	43	6714	6729	14
859417	N/A	N/A	CTCTTGCTGCTCC AA	55	6719	6734	15
859421	N/A	N/A	TTTAGCTCTTGCT GC	45	6724	6739	16
859425	N/A	N/A	GCAAGTCCCTGCTA GA	18	11238	11253	17
859429	N/A	N/A	CACCTGCAAGTCCC TG	15	11243	11258	18
859433	N/A	N/A	ATTGCCACCTGCAA GT	4	11248	11263	19

8594 37	N/A	N/A	TCATTCTCTCCTCA GG	58	11294	11309	20
8594 41	N/A	N/A	TGGACCCACCACAT TG	34	11383	11398	21
8594 45	N/A	N/A	TGCATGGACCCACC AC	61	11387	11402	22
8594 49	N/A	N/A	CATGTTGCATGGAC CC	61	11392	11407	23
8594 53	N/A	N/A	ACAGTAGCCCCC AAC	46	11608	11623	24
8594 57	N/A	N/A	TCACACAGTAGCCC CC	52	11612	11627	25
8594 61	N/A	N/A	AAAGTCACACAGT AGC	51	11616	11631	26
8594 65	N/A	N/A	GGTCACACAGTTTG GG	58	11639	11654	27
8594 69	N/A	N/A	ACATATGCAAGGT CAC	74	11649	11664	28
8594 73	N/A	N/A	ACTCAGACATATGC AA	32	11655	11670	29
8594 77	N/A	N/A	AGTGTCCCTCTGG TC	59	11950	11965	30
8594 81	N/A	N/A	TGCCAGTGTCCCTC TT	37	11954	11969	31
8594 85	N/A	N/A	TGATCCTCTGCCAG TG	58	11962	11977	32
8594 89	N/A	N/A	TCTGTGATCCTCTG CC	50	11966	11981	33
8594 93	N/A	N/A	GGTCTCTGTGATCC TC	67	11970	11985	34
8594 97	N/A	N/A	AGCTCTAGGGCCC ATG	6	12671	12686	35
8595 01	N/A	N/A	AGCCAGCTCTAGG GCC	0	12675	12690	36
8595 05	N/A	N/A	GTGGGTGCTCAAA ACG	28	12924	12939	37
8595 09	N/A	N/A	AATAATGCCCCCGT AG	26	13176	13191	38
8595 13	N/A	N/A	CTGGTTAATAATGC CC	47	13182	13197	39
8595 17	N/A	N/A	CTGGATACATTGGC AG	25	14125	14140	40

## 042765

8595 21	N/A	N/A	CTCTGAGTGTGTTA GG	54	14473	14488	41
8595 25	N/A	N/A	TGCTCTCTGAGTGT GT	26	14477	14492	42
8595 29	N/A	N/A	GCATGCTGAGCAG GTC	78	14541	14556	43
8595 33	N/A	N/A	TGTAGCATGCTGAG CA	73	14545	14560	44
8595 37	N/A	N/A	ATTCAGTGGCTGCT CT	0	14755	14770	45
8595 41	N/A	N/A	GAGCAATTCAGTG GCT	24	14760	14775	46
8593 10	979	994	TCCTCGGGCACATT CT	34	16371	16386	47
4684 60	1075	1090	TTGGCCACGCCGGC AT	8	16705	16720	48
8595 45	N/A	N/A	ATTAGCAGCTACG GC	35	17441	17456	49
8595 49	N/A	N/A	CAACTATTTAGCAG CT	36	17446	17461	50
8595 53	N/A	N/A	AGGTTACCGCTGTC AG	73	20914	20929	51
8595 57	N/A	N/A	GACCTAGGTTACCG CT	33	20919	20934	52
8593 14	1498	1513	CCACTCTGTGACAC AA	79	21470	21485	53
8593 18	1503	1518	ATGTCCCACTCTGT GA	49	21475	21490	54
8595 61	N/A	N/A	CTCGAAGGTAAGC CGC	66	21891	21906	55

## 042765

8595 65	N/A	N/A	CAGCACTGTCCTGC AG	20	22880	22895	56
8595 69	N/A	N/A	TTTTTGCTGGTTTG AG	34	23030	23045	57
8595 73	N/A	N/A	CACTTTTTTGCTGG TT	58	23034	23049	58
8595 77	N/A	N/A	AATCCACTTTTT GC	15	23039	23054	59
8595 81	N/A	N/A	ATCTGTGCACTATC CT	28	23069	23084	60
8595 85	N/A	N/A	TGGCATCTGTGCAC TA	55	23073	23088	61
8595 89	N/A	N/A	TCTCACACGAGCAT TA	16	23176	23191	62
8595 93	N/A	N/A	CTGCCTCTCACACG AG	46	23181	23196	63
8595 97	N/A	N/A	TCTTATGGAGGAG GAA	23	23853	23868	64
8596 01	N/A	N/A	TGTTTTCGACACAG GG	68	24225	24240	65
8596 05	N/A	N/A	GGCATGTTTTCGAC AC	68	24229	24244	66
8596 09	N/A	N/A	CATCTTTCAGTAC TC	43	26516	26531	67
8596 13	N/A	N/A	ATCGCATCTTTTCA GT	31	26520	26535	68
8593 22	2429	2444	CTGTCCTGGAGCT CC	26	27572	27587	69
8593 25	2495	2510	GTCGGAACCATTTT AA	34	27638	27653	70

## 042765

8593 29	2501	2516	GGACAAGTCGGAA CCA	29	27644	27659	71
8593 33	2505	2520	AGAGGGACAAGTC GGA	61	27648	27663	72
8593 37	3461	3476	ATCTCCGCCAGGCC AG	24	28604	28619	73
8593 41	3465	3480	AAGCATCTCCGCCA GG	68	28608	28623	74
8593 45	3470	3485	CTTAGAAGCATCTC CG	61	28613	28628	75
8593 49	3476	3491	CCATGCCTTAGAAG CA	58	28619	28634	76
8593 53	3538	3553	TGTCTGCTTGCTTG GG	62	28681	28696	77
8593 57	3544	3559	GATAAATGTCTGCT TG	37	28687	28702	78
8593 61	3593	3608	GTCTAGAAAAGTT GGC	63	28736	28751	79
8593 65	3597	3612	ACAGGTCTAGAAA AGT	64	28740	28755	80
8593 69	3606	3621	AAAAGCAAAACAG GTC	33	28749	28764	81

Таблица 2

Подавление mRNA PCSK9 с помощью сEt-гэпмеров 3-10-3, нацеливающихся на SEQ ID NO: 1 и 2

№ ISIS	SEQ ID: 1, стартовый сайт	SEQ ID: 1, стоп сайт	Последовательность	% подавления	SEQ ID: 2, старто	SEQ ID 2: стоп	SEQ ID NO
		- сайт			вый сайт	- сайт	
4311 31	1015	1034	GTCACACTTGCTGGC CTGTC	0	N/A	N/A	3
8593 74	N/A	N/A	ATCTGCCGTCCTCCC	42	4563	4578	82
8593 78	N/A	N/A	CAGCATCTGCCGTCC T	62	4567	4582	83
8593 82	N/A	N/A	CTTGTC AAGCACCAC A	61	5012	5027	84
8593 86	N/A	N/A	GTGACTTGTC AAGCA C	10	5016	5031	85
8593 90	N/A	N/A	TGTAAGTTC ACTCAT G	56	5134	5149	86
8593 94	N/A	N/A	TGCATTGTAAGT TCA C	71	5139	5154	87
8593 98	N/A	N/A	GGGCTTGCATTGTAA G	13	5144	5159	88
8594 02	N/A	N/A	TGGTTTTCCCAGCTCT	78	5898	5913	89
8594 06	N/A	N/A	CCTCTGGTTTTCCCAG	61	5902	5917	90
8594 10	N/A	N/A	TCCACCTCTGGTTTTTC	41	5906	5921	91
8594 14	N/A	N/A	TTGTCTGCTCCA ACT G	39	6716	6731	92
8594 18	N/A	N/A	GCTCTGTCTGCTCCA	71	6720	6735	93

## 042765

8594 22	N/A	N/A	TATAAATCTCCCATC C	0	7280	7295	94
8594 26	N/A	N/A	CTGCAAGTCCCTGCT A	12	11240	1125 5	95
8594 30	N/A	N/A	CCACCTGCAAGTCCC T	26	11244	1125 9	96
8594 34	N/A	N/A	CTCTCCTCAGGCCAG G	64	11289	1130 4	97
8594 38	N/A	N/A	CCCACCACATTGCAT C	37	11379	1139 4	98
8594 42	N/A	N/A	ATGGACCCACCACAT T	10	11384	1139 9	99
8594 46	N/A	N/A	TTGCATGGACCCACC A	40	11388	1140 3	100
8594 50	N/A	N/A	CGAGAACCGGTAAGG G	34	11447	1146 2	101
8594 54	N/A	N/A	CACAGTAGCCCCCA A	32	11609	1162 4	102
8594 58	N/A	N/A	GTCACACAGTAGCCC C	69	11613	1162 8	103
8594 62	N/A	N/A	GCAAAGTCACACAGT A	64	11618	1163 3	104
8594 66	N/A	N/A	AGGTCACACAGTTTG G	83	11640	1165 5	105
8594 70	N/A	N/A	GACATATGCAAGGTC A	40	11650	1166 5	106
8594 74	N/A	N/A	TCCCTCTGGTCTCTG G	55	11946	1196 1	107
8594 78	N/A	N/A	CAGTGTCCTCTTGG T	67	11951	1196 6	108

## 042765

8594 82	N/A	N/A	CTGCCAGTGTCCCTC T	1	11955	1197 0	109
8594 86	N/A	N/A	GTGATCCTCTGCCAG T	35	11963	1197 8	110
8594 90	N/A	N/A	CTCTGTGATCCTCTGC	68	11967	1198 2	111
8594 94	N/A	N/A	GGGTCTCTGTGATCC T	33	11971	1198 6	112
8594 98	N/A	N/A	CAGCTCTAGGGCCCA T	56	12672	1268 7	113
8595 02	N/A	N/A	CAGCCAGCTCTAGGG C	31	12676	1269 1	114
8595 06	N/A	N/A	AGTGGGTGCTCAAAA C	23	12925	1294 0	115
8595 10	N/A	N/A	TTAATAATGCCCCCG T	32	13178	1319 3	116
8595 14	N/A	N/A	CCTGGTTAATAATGC C	36	13183	1319 8	117
8595 18	N/A	N/A	GAGTGTGTTAGGAGC T	83	14469	1448 4	118
8595 22	N/A	N/A	TCTCTGAGTGTGTTA G	21	14474	1448 9	119
8595 26	N/A	N/A	CTTGCTCTCTGAGTGT	42	14479	1449 4	120
8595 30	N/A	N/A	AGCATGCTGAGCAGG T	54	14542	1455 7	121
8595 34	N/A	N/A	CTGTAGCATGCTGAG C	71	14546	1456 1	122
8595 38	N/A	N/A	AATTCAGTGGCTGCT C	27	14756	1477 1	123

## 042765

8595 42	N/A	N/A	AGAGCAATTCAGTGG C	42	14761	1477 6	124
8593 11	981	996	CCTCCTCGGGCACAT T	14	16373	1638 8	125
4684 60	1075	1090	TTGGCCACGCCGCA T	0	16705	1672 0	48
8595 46	N/A	N/A	CTATTTAGCAGCTAC G	57	17443	1745 8	126
8595 50	N/A	N/A	TCAACTATTTAGCAG C	56	17447	1746 2	127
8595 54	N/A	N/A	TAGGTTACCGCTGTC A	47	20915	2093 0	128
8595 58	N/A	N/A	GGACCTAGGTTACCG C	49	20920	2093 5	129
8593 15	1499	1514	CCCACTCTGTGACAC A	94	21471	2148 6	130
8593 19	1505	1520	TGATGTCCCACTCTG T	31	21477	2149 2	131
8595 62	N/A	N/A	GTCCTGCAGCCTCTA G	30	22873	2288 8	132
8595 66	N/A	N/A	CCAGCACTGTCCTGC A	54	22881	2289 6	133
8595 70	N/A	N/A	TTTTTTGCTGGTTGA	33	23031	2304 6	134
8595 74	N/A	N/A	CCACTTTTTTGCTGGT	21	23035	2305 0	135
8595 78	N/A	N/A	CAATTCCACTTTTTTG	41	23040	2305 5	136
8595 82	N/A	N/A	CATCTGTGCACTATC C	48	23070	2308 5	137

## 042765

8595 86	N/A	N/A	ATGGCATCTGTGCAC T	30	23074	2308 9	138
8595 90	N/A	N/A	CCTCTCACACGAGCA T	48	23178	2319 3	139
8595 94	N/A	N/A	TCTGCCTCTCACACG A	29	23182	2319 7	140
8595 98	N/A	N/A	TTCGACACAGGGTAG C	67	24221	2423 6	141
8596 02	N/A	N/A	ATGTTTTTCGACACAG G	66	24226	2424 1	142
8596 06	N/A	N/A	TGGGCATGTTTTCGA C	0	24231	2424 6	143
8596 10	N/A	N/A	GCATCTTTTCAGTACT	55	26517	2653 2	144
8596 14	N/A	N/A	CATCGCATCTTTTCA G	40	26521	2653 6	145
4684 84	2430	2445	GCTGTCACTGGAGCT C	46	27573	2758 8	146
8593 26	2497	2512	AAGTCGGAACCATTT T	56	27640	2765 5	147
8593 30	2502	2517	GGGACAAGTCGGAAC C	57	27645	2766 0	148
8593 34	3458	3473	TCCGCCAGGCCAGTG A	33	28601	2861 6	149
8593 38	3462	3477	CATCTCCGCCAGGCC A	57	28605	2862 0	150
8593 42	3466	3481	GAAGCATCTCCGCCA G	56	28609	2862 4	151
8593 46	3472	3487	GCCTTAGAAGCATCT C	67	28615	2863 0	152
8593 50	3477	3492	ACCATGCCTTAGAAG C	41	28620	2863 5	153
8593 54	3540	3555	AATGTCTGCTTGCTT G	69	28683	2869 8	154
8593 58	3546	3561	AAGATAAATGTCTGC T	69	28689	2870 4	155
8593 62	3594	3609	GGTCTAGAAAAGTTG G	51	28737	2875 2	156
8593 66	3602	3617	GCAAAACAGGTCTAG A	52	28745	2876 0	157
8593 70	3632	3647	ACCCAGAATAAATAT C	28	28775	2879 0	158

Таблица 3

Подавление mRNA PCSK9 с помощью сЕт-гэпмеров 3-10-3, нацеливающих на SEQ ID NO: 1 и 2

№ ISIS	SEQ ID: 1, стартовый сайт	SEQ ID: 1, стоп-сайт	Последовательность	% подавления	SEQ ID: 2, стартовый сайт	SEQ ID 2: стоп-сайт	SEQ ID NO
431131	1015	1034	GTCACACTTGCTGGC CTGTC	10	N/A	N/A	3
859375	N/A	N/A	CATCTGCCGTCCTTC C	28	4564	4579	159
859379	N/A	N/A	CCAGCATCTGCCGTC C	55	4568	4583	160
859383	N/A	N/A	ACTTGTC AAGCACC AC	66	5013	5028	161
859387	N/A	N/A	AGTGACTTGTC AAG CA	84	5017	5032	162
859391	N/A	N/A	ATTGTAAGTTCACTC A	70	5136	5151	163
859395	N/A	N/A	TTGCATTGTAAGTTC A	82	5140	5155	164
859399	N/A	N/A	AAATTGAATGAATT GG	26	5768	5783	165
859403	N/A	N/A	CTGGTTTTCCCAGCT C	73	5899	5914	166
859407	N/A	N/A	ACCTCTGGTTTTCCC A	77	5903	5918	167
859411	N/A	N/A	TTCCACCTCTGGTTT T	23	5907	5922	168
859415	N/A	N/A	CTTGTCTGCTCCAAC T	22	6717	6732	169
859419	N/A	N/A	AGCTCTTGTCTGCTC C	81	6721	6736	170
859423	N/A	N/A	ATTGAGGGAAAAAA TC	12	7468	7483	171

## 042765

8594 27	N/A	N/A	CCTGCAAGTCCCTGC T	42	11241	1125 6	172
8594 31	N/A	N/A	GCCACCTGCAAGTC CC	47	11245	1126 0	173
8594 35	N/A	N/A	ATTCTCTCCTCAGGC C	52	11292	1130 7	174
8594 39	N/A	N/A	GACCCACCACATTG CA	48	11381	1139 6	175
8594 43	N/A	N/A	CATGGACCCACCAC AT	25	11385	1140 0	176
8594 47	N/A	N/A	GTTGCATGGACCCA CC	65	11389	1140 4	177
8594 51	N/A	N/A	AGTAGCCCCCAAC TT	0	11606	1162 1	178
8594 55	N/A	N/A	ACACAGTAGCCCC CA	42	11610	1162 5	179
8594 59	N/A	N/A	AGTCACACAGTAGC CC	83	11614	1162 9	180
8594 63	N/A	N/A	CACACAGTTTGGGT GT	37	11636	1165 1	181
8594 67	N/A	N/A	ATATGCAAGGTCAC AC	49	11647	1166 2	182
8594 71	N/A	N/A	AGACATATGCAAGG TC	46	11651	1166 6	183
8594 75	N/A	N/A	TGTCCTCTTGGTCT C	61	11948	1196 3	184
8594 79	N/A	N/A	CCAGTGCCCTCTTG G	35	11952	1196 7	185
8594 83	N/A	N/A	TCTGCCAGTGCCCT C	27	11956	1197 1	186
8594 87	N/A	N/A	TGTGATCCTTGCCA G	42	11964	1197 9	187
8594 91	N/A	N/A	TCTCTGTGATCCTCT G	73	11968	1198 3	188
8594 95	N/A	N/A	TCTAGGGCCCATGCT T	21	12668	1268 3	189
8594 99	N/A	N/A	CCAGCTCTAGGGCC CA	53	12673	1268 8	190
8595 03	N/A	N/A	GGCAGCCAGCTCTA GG	42	12678	1269 3	191

## 042765

8595 07	N/A	N/A	CGCACAGTGGGTGC TC	41	12930	1294 5	192
8595 11	N/A	N/A	GGTTAATAATGCCCC C	58	13180	1319 5	193
8595 15	N/A	N/A	GCCTGGTTAATAATG C	0	13184	1319 9	194
8595 19	N/A	N/A	CTGAGTGTGTTAGG AG	52	14471	1448 6	195
8595 23	N/A	N/A	CTCTCTGAGTGTGTT A	57	14475	1449 0	196
8595 27	N/A	N/A	TGCTGAGCAGGTCCT T	47	14538	1455 3	197
8595 31	N/A	N/A	TAGCATGCTGAGCA GG	79	14543	1455 8	198
8595 35	N/A	N/A	TTCTGTAGCATGCTG A	50	14548	1456 3	199
8595 39	N/A	N/A	CAATTCAGTGGCTGC T	62	14757	1477 2	200
8595 43	N/A	N/A	ACAGAGCAATTCAG TG	49	14763	1477 8	201
4684 60	1075	1090	TTGGCCACGCCGGC AT	29	16705	1672 0	48
8595 47	N/A	N/A	ACTATTTAGCAGCTA C	65	17444	1745 9	202
8595 51	N/A	N/A	GTCAACTATTTAGCA G	73	17448	1746 3	203
8595 55	N/A	N/A	CTAGGTTACCGCTGT C	60	20916	2093 1	204
8595 59	N/A	N/A	GGGACCTAGGTTAC CG	31	20921	2093 6	205

## 042765

8593 12	1495	1510	CTCTGTGACACAAA GC	69	21467	2148 2	206
8593 16	1501	1516	GTCCCACTCTGTGAC A	66	21473	2148 8	207
8595 63	N/A	N/A	GCACTGTCCTGCAGC C	44	22878	2289 3	208
8595 67	N/A	N/A	ATCCAGCACTGTCCT G	47	22883	2289 8	209
8595 71	N/A	N/A	CTTTTTGCTGGTTT G	77	23032	2304 7	210
8595 75	N/A	N/A	TCCACTTTTTGCTG G	0	23036	2305 1	211
8595 79	N/A	N/A	TGTGCACTATCCTGT A	39	23066	2308 1	212
8595 83	N/A	N/A	GCATCTGTGCACTAT C	73	23071	2308 6	213
8595 87	N/A	N/A	AGATGGCATCTGTG CA	65	23076	2309 1	214
8595 91	N/A	N/A	GCCTCTCACACGAG CA	57	23179	2319 4	215
8595 95	N/A	N/A	ACTCTGCCTCTCACA C	27	23184	2319 9	216
8595 99	N/A	N/A	TTTTCGACACAGGGT A	69	24223	2423 8	217
8596 03	N/A	N/A	CATGTTTTCGACACA G	69	24227	2424 2	218
8596 07	N/A	N/A	CTTTTCAGTACTCTA T	28	26513	2652 8	219
8596 11	N/A	N/A	CGCATCTTTTCAGTA C	70	26518	2653 3	220

## 042765

8596 15	N/A	N/A	TCCATCGCATCTTT C	51	26523	2653 8	221
8593 20	2425	2440	CACTGGAGCTCCTG GG	45	27568	2758 3	222
8593 23	2431	2446	GGCTGTCACTGGAG CT	33	27574	2758 9	223
8593 27	2498	2513	CAAGTCGGAACCAT TT	52	27641	2765 6	224
8593 31	2503	2518	AGGGACAAGTCGGA AC	28	27646	2766 1	225
8593 35	3459	3474	CTCCGCCAGGCCAG TG	25	28602	2861 7	226
8593 39	3463	3478	GCATCTCCGCCAGG CC	56	28606	2862 1	227
8593 43	3467	3482	AGAAGCATCTCCGC CA	63	28610	2862 5	228
8593 47	3474	3489	ATGCCTTAGAAGCA TC	8	28617	2863 2	229
8593 51	3478	3493	GACCATGCCTTAGA AG	30	28621	2863 6	230
8593 55	3541	3556	AAATGTCTGCTTGCT T	51	28684	2869 9	231
8593 59	3589	3604	AGAAAAGTTGGCTG TA	37	28732	2874 7	232
8593 63	3595	3610	AGGTCTAGAAAAGT TG	74	28738	2875 3	233
8593 67	3604	3619	AAGCAAAACAGGTC TA	37	28747	2876 2	234
8593 71	3633	3648	AACCCAGAATAAAT AT	30	28776	2879 1	235

Таблица 4  
 Подавление mRNA PCSK9 с помощью сЕт-гэпмеров 3-10-3, нацеливающихся на  
 SEQ ID NO: 1 и 2

№ ISIS	SEQ ID: 1, стартовый сайт	SEQ ID: 1, стоп- сайт	Последовательность	% подавления	SEQ ID: 2, стартовый сайт	SEQ ID 2: стоп- сайт	SEQ ID NO
43113 1	1015	1034	GTCACACTTGCTGGCCT GTC	0	N/A	N/A	3
46846 0	1075	1090	TTGGCCACGCCGGCAT	25	16705	16720	48
85931 3	1497	1512	CACTCTGTGACACAAA	59	21469	21484	236
85931 7	1502	1517	TGTCCTACTCTGTGAC	10	21474	21489	237
85932 1	2428	2443	TGTCCTGGAGCTCCT	17	27571	27586	238
85932 4	2432	2447	GGGCTGTCACTGGAGC	46	27575	27590	239
85932 8	2499	2514	ACAAGTCGGAACCATT	60	27642	27657	240
85933 2	2504	2519	GAGGGACAAGTCGGAA	1	27647	27662	241
85933 6	3460	3475	TCTCCGCCAGGCCAGT	20	28603	28618	242
85934 0	3464	3479	AGCATCTCCGCCAGGC	60	28607	28622	243
85934 4	3468	3483	TAGAAGCATCTCCGCC	59	28611	28626	244

## 042765

85934 8	3475	3490	CATGCCTTAGAAGCAT	0	28618	28633	245
85935 2	3480	3495	CCGACCATGCCTTAGA	63	28623	28638	246
85935 6	3542	3557	TAAATGTCTGCTTGCT	67	28685	28700	247
85936 0	3591	3606	CTAGAAAAGTTGGCTG	59	28734	28749	248
85936 4	3596	3611	CAGGTCTAGAAAAGTT	44	28739	28754	249
85936 8	3605	3620	AAAGCAAAACAGGTCT	62	28748	28763	250
85937 2	N/A	N/A	TGCCGTCCTCCCACC	17	4560	4575	251
85937 6	N/A	N/A	GCATCTGCCGTCCTTC	40	4565	4580	252
85938 0	N/A	N/A	TCCCAGCATCTGCCGT	49	4570	4585	253
85938 4	N/A	N/A	GACTTGTC AAGCACCA	83	5014	5029	254
85938 8	N/A	N/A	AAGTGA CTTGTC AAGC	77	5018	5033	255
85939 2	N/A	N/A	CATTGTAAGTTC ACTC	77	5137	5152	256
85939 6	N/A	N/A	CTTGCA TTGTAAGTTC	65	5141	5156	257
85940 0	N/A	N/A	TTCCCAGCTCTGTAT	28	5894	5909	258
85940 4	N/A	N/A	TCTGGTTTTCCCAGCT	48	5900	5915	259

## 042765

85940 8	N/A	N/A	CACCTCTGGTTTTCCC	78	5904	5919	260
85941 2	N/A	N/A	CTTCCACCTCTGGTTT	28	5908	5923	261
85941 6	N/A	N/A	TCTGTCTGCTCCAAC	13	6718	6733	262
85942 0	N/A	N/A	TAGCTCTTGTCTGCTC	39	6722	6737	263
85942 4	N/A	N/A	ACCCTAGGTGTACTTT	27	7779	7794	264
85942 8	N/A	N/A	ACCTGCAAGTCCCTGC	31	11242	11257	265
85943 2	N/A	N/A	TGCCACCTGCAAGTCC	44	11246	11261	266
85943 6	N/A	N/A	CATTCTCTCCTCAGGC	38	11293	11308	267
85944 0	N/A	N/A	GGACCCACCACATTGC	19	11382	11397	268
85944 4	N/A	N/A	GCATGGACCCACCACA	56	11386	11401	269
85944 8	N/A	N/A	TGTTGCATGGACCCAC	53	11390	11405	270
85945 2	N/A	N/A	CAGTAGCCCCCAACT	19	11607	11622	271
85945 6	N/A	N/A	CACACAGTAGCCCCC	56	11611	11626	272
85946 0	N/A	N/A	AAGTCACACAGTAGCC	32	11615	11630	273
85946 4	N/A	N/A	GTCACACAGTTTGGGT	69	11638	11653	274

## 042765

85946 8	N/A	N/A	CATATGCAAGGTCACA	59	11648	11663	275
85947 2	N/A	N/A	TCAGACATATGCAAGG	72	11653	11668	276
85947 6	N/A	N/A	GTGTCCCTCTTGGTCT	67	11949	11964	277
85948 0	N/A	N/A	GCCAGTGTCCCTCTTG	46	11953	11968	278
85948 4	N/A	N/A	CCTCTGCCAGTGTCCC	34	11958	11973	279
85948 8	N/A	N/A	CTGTGATCCTCTGCCA	58	11965	11980	280
85949 2	N/A	N/A	GTCTCTGTGATCCTCT	71	11969	11984	281
85949 6	N/A	N/A	GCTCTAGGGCCCATGC	16	12670	12685	282
85950 0	N/A	N/A	GCCAGCTCTAGGGCCC	16	12674	12689	283
85950 4	N/A	N/A	AGAGAAATGCATGCTA	68	12841	12856	284
85950 8	N/A	N/A	GGCGCACAGTGGGTGC	0	12932	12947	285
85951 2	N/A	N/A	TGGTTAATAATGCCCC	40	13181	13196	286
85951 6	N/A	N/A	TTGCCTGGTTAATAAT	12	13186	13201	287
85952 0	N/A	N/A	TCTGAGTGTGTTAGGA	62	14472	14487	288
85952 4	N/A	N/A	GCTCTCTGAGTGTGTT	56	14476	14491	289

## 042765

85952 8	N/A	N/A	CATGCTGAGCAGGTCC	66	14540	14555	290
85953 2	N/A	N/A	GTAGCATGCTGAGCAG	79	14544	14559	291
85953 6	N/A	N/A	TCAGTGGCTGCTCTGA	24	14753	14768	292
85954 0	N/A	N/A	GCAATTCAGTGGCTGC	33	14758	14773	293
85954 4	N/A	N/A	TAGTTAACACACAGAA	17	16208	16223	294
85954 8	N/A	N/A	AACTATTTAGCAGCTA	43	17445	17460	295
85955 2	N/A	N/A	CGTCAACTATTTAGCA	66	17449	17464	296
85955 6	N/A	N/A	CCTAGGTTACCGCTGT	33	20917	20932	297
85956 0	N/A	N/A	GCACAGACCCTGACTG	23	21567	21582	298
85956 4	N/A	N/A	AGCACTGTCCTGCAGC	48	22879	22894	299
85956 8	N/A	N/A	TTTTGCTGGTTTGAGA	52	23029	23044	300
85957 2	N/A	N/A	ACTTTTTTGCTGGTTT	70	23033	23048	301
85957 6	N/A	N/A	ATTCCAATTTTTGCT	24	23038	23053	302
85958 0	N/A	N/A	TCTGTGCACTATCCTG	38	23068	23083	303
85958 4	N/A	N/A	GGCATCTGTGCACTAT	75	23072	23087	304

85958 8	N/A	N/A	TCACACGAGCATTAAG	34	23174	23189	305
85959 2	N/A	N/A	TGCCTCTCACACGAGC	38	23180	23195	306
85959 6	N/A	N/A	TAGACAGGATCAACTC	18	23406	23421	307
85960 0	N/A	N/A	GTTTTTCGACACAGGGT	61	24224	24239	308
85960 4	N/A	N/A	GCATGTTTTTCGACACA	63	24228	24243	309
85960 8	N/A	N/A	ATCTTTTCAGTACTCT	48	26515	26530	310
85961 2	N/A	N/A	TCGCATCTTTTCAGTA	31	26519	26534	311
85961 6	N/A	N/A	AGCAGCTAGGCCACAG	20	26841	26856	312

## Исследование 2.

Культивируемые клетки HepG2 при плотности 20000 клеток на лунку трансфицировали путем электропорации с помощью 3000 нМ антисмыслового олигонуклеотида. После периода обработки, составлявшего примерно 24 ч, РНК выделяли из клеток и измеряли уровни mRNA PCSK9 с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Для измерения уровней mRNA использовали набор праймеров и зондов для PCSK9 человека от ABI (ID № Hs03037355\_m1). Уровни mRNA PCSK9 корректировали в соответствии с общим содержанием РНК, измеренным с помощью RIBOGREEN®. Результаты представлены в виде процента подавления PCSK9 по сравнению с необработанными контрольными клетками.

Таблица 5

Подавление mRNA PCSK9 с помощью сEt-гэпмеров 3-10-3, нацеливающихся на SEQ ID NO: 1 и 2

№ ISIS	SEQ ID: 1, стартовый сайт	SEQ ID: 1, стоп-сайт	Последовательность	% подавления	SEQ ID: 2, стартовый сайт	SEQ ID: 2, стоп-сайт	SEQ ID NO
848304	757	772	AACTTCAAGGCCA GCT	66	N/A	N/A	313
848215	108	123	CTGAACTGAACGG CGG	68	3583	3598	314
848231	320	335	GGCGAGGAGACCT AGA	87	3795	3810	315
848247	485	500	ACGCAAGGCTAGC ACC	77	3960	3975	316
848788	N/A	N/A	GGCAAGCCCGCTTT CT	88	4456	4471	317
848804	N/A	N/A	CCCTTTTAAAGATT AG	67	5053	5068	318
848820	N/A	N/A	CCAGAGAAGAAAC ATC	62	5524	5539	319

## 042765

848836	N/A	N/A	AAGAATCTGGAGC TGC	84	6430	6445	320
848852	N/A	N/A	CACTGAGGACCAA ATT	65	6806	6821	321
848868	N/A	N/A	GCTATATAAAGGA ATA	65	7161	7176	322
848884	N/A	N/A	CATGAGCAAGTCA CTC	65	7387	7402	323
848900	N/A	N/A	AGTATAGTAGATG ATA	82	7720	7735	324
848262	614	629	CGAGAGGTGGGTC TCC	54	7887	7902	325
466848	673	688	GTGAGGTATCCCCG GC	88	7946	7961	326
848289	689	704	GACATGCAGGATCT TG	79	7962	7977	327
848916	N/A	N/A	GGGAATTCTATACA GA	72	8193	8208	328
848932	N/A	N/A	CACCGAAGATGTG ACA	51	8521	8536	329
848948	N/A	N/A	AAGGGAAAGGCTT GAG	53	9040	9055	330
848964	N/A	N/A	CCCCACAGGCAGC CTC	61	9610	9625	331
848980	N/A	N/A	CCGGAGGACAGAC TAG	27	10368	10383	332
848319	862	877	TGGTATTCATCCGC CC	60	10623	10638	333
848996	N/A	N/A	AGCCAAACGGAGC TGG	51	11093	11108	334
849012	N/A	N/A	AAAGGAACAGGCT CTT	56	11842	11857	335
849028	N/A	N/A	CTCTAGGGCCCATG CT	56	12669	12684	336
849044	N/A	N/A	GGATACACAGGCT CGC	96	13108	13123	337
849060	N/A	N/A	GATGATGTGACCAC TG	86	13864	13879	338
849076	N/A	N/A	GGCCAGCAAGGTG GGC	35	14277	14292	339
849092	N/A	N/A	TGCTAGTAGGTCTG GG	72	14675	14690	340

## 042765

849108	N/A	N/A	CCAAAGGAAGACT TCA	70	15400	15415	341
849124	N/A	N/A	ATTTAAAGACTCAA AG	16	15870	15885	342
849140	N/A	N/A	ACATTTGTGGGAGA GG	56	16250	16265	343
848334	984	999	CGTCCTCCTCGGGC AC	85	16376	16391	344
848348	1018	1033	TCACACTTGCTGGC CT	52	16648	16663	345
848364	1061	1076	ATCCCGGCCGCTGA CC	57	16691	16706	346
468460	1075	1090	TTGGCCACGCCGGC AT	48	16705	16720	48
848379	1085	1100	GCTGGCACCCCTTGG CC	57	16715	16730	347
849156	N/A	N/A	AAGACATAAAGAC ATC	89	17083	17098	348
849172	N/A	N/A	CAGAAGGTTATTGA TT	68	17735	17750	349
849188	N/A	N/A	TGCTAGTTATTAAG CA	15	18080	18095	350
849204	N/A	N/A	CAGTAACAGCTCTT TT	80	19020	19035	351
849220	N/A	N/A	CCTTATTATCCCTT TC	70	19396	19411	352
849236	N/A	N/A	CAACATCAAATTCT GC	92	19658	19673	353
848395	1165	1180	TTCCGAATAAACTC CA	73	19996	20011	354

## 042765

848411	1345	1360	ACCTCGGGAGCTG AGG	20	20176	20191	355
849252	N/A	N/A	GATGGAGGTTTCGA GC	87	20381	20396	356
849268	N/A	N/A	TATCAAGTGGTTCT AA	44	21039	21054	357
848427	1458	1473	CACCAATGATGTCC TC	45	21430	21445	358
849284	N/A	N/A	TCTTATCGGCCAGG TG	75	21810	21825	359
848443	1608	1623	TGGCAGAGAAGTG GAT	21	22101	22116	360
848459	1730	1745	CCATACAGTCCTGC AA	40	22512	22527	361
848475	1807	1822	GAGCAGCTCAGCA GCT	44	22589	22604	362
849300	N/A	N/A	TACAGAAGAGCTG GAG	61	22767	22782	363
849316	N/A	N/A	ACACAGAGTGGTTT CA	79	23262	23277	364
848489	1951	1966	CTGCAGTTGGCCTG GG	57	23571	23586	365
848505	2006	2021	GTGGCAGTGGACA CGG	71	23626	23641	366
849332	N/A	N/A	AGGAGAAGTAAGG TCA	91	23828	23843	367
849348	N/A	N/A	GGGCATGTTTTCGA CA	65	24230	24245	368
849364	N/A	N/A	TTCCACCCAGAGAT GG	34	25105	25120	369

## 042765

849380	N/A	N/A	CGGTATGGTGGTGG CA	71	25630	25645	370
849396	N/A	N/A	GGGCAAGTGGATC CAA	38	26364	26379	371
849412	N/A	N/A	CCACACTTCATTTT TC	35	27298	27313	372
848521	2225	2240	GCAGGCCACGGTC ACC	67	27368	27383	373
848537	2483	2498	TTAAAGCTCAGCCC CA	67	27626	27641	374
848553	2560	2575	CCCCGAAAGGCG GAA	39	27703	27718	375
848569	2704	2719	CCGAGCACAGCTC GAC	62	27847	27862	376
848584	2739	2754	ACGGACATCGGCA CAT	92	27882	27897	377
848600	2776	2791	GGCACGGAACAAG AGC	87	27919	27934	378
848616	2888	2903	ACCTTTCACACTCA CC	92	28031	28046	379
468491	2971	2986	TGCCATCCAGAAA GCT	64	28114	28129	380
848646	3085	3100	CACCTTTGGGTGTT GC	80	28228	28243	381
848662	3132	3147	CCACTGCACACTGC CG	87	28275	28290	382
848678	3220	3235	TGGTTCAGGTTTC TT	87	28363	28378	383
848693	3253	3268	CCTGCTGTGTGAGC TT	93	28396	28411	384
848709	3290	3305	CTTCAGAGCCAGCC CA	65	28433	28448	385
848725	3380	3395	CCGAGCTTCCTGGT CT	92	28523	28538	386
848741	3433	3448	GGGTGATAACGGA AAA	62	28576	28591	387
848756	3547	3562	AAAGATAAATGTCT GC	92	28690	28705	388
848772	3631	3646	CCCAGAATAAATAT CT	89	28774	28789	389

Таблица 6

Подавление mRNA PCSK9 с помощью сЕт-гэпмеров 3-10-3, нацеливающих на SEQ ID NO: 1 и 2

№ ISIS	SEQ ID: 1, стартовый сайт	SEQ ID: 1, стоп-сайт	Последовательность	PCSK9 (% подавления)	SEQ ID: 2, стартовый сайт	SEQ ID: 2, стоп-сайт	SEQ ID NO
848216	123	138	CTCCAGGCTCAGACC C	82	3598	3613	390
848232	353	368	GCCCATGAGGGCCAG G	67	3828	3843	391
848248	486	501	AACGCAAGGCTAGCA C	62	3961	3976	392
848789	N/A	N/A	CTATAATGGCAAGCC C	76	4463	4478	393
848805	N/A	N/A	CGTAGGGACGATTGT C	65	5073	5088	394
848821	N/A	N/A	ATGAACTGAGGAGG C	85	5558	5573	395
848837	N/A	N/A	TTGGAAGAATCTGGA G	81	6434	6449	396
848853	N/A	N/A	CAACACTGAGGACCA A	77	6809	6824	397
848869	N/A	N/A	GGCAACACTTCTTAA A	60	7219	7234	398
848885	N/A	N/A	GTGCAGCCATGAGCA A	73	7394	7409	399
848901	N/A	N/A	ACAGAGTATAGTAGA T	73	7724	7739	400
848263	616	631	TGCGAGAGGTGGGTC T	42	7889	7904	401
848275	674	689	GGTGAGGTATCCCCG G	67	7947	7962	402
848290	690	705	AGACATGCAGGATCT T	56	7963	7978	403
848917	N/A	N/A	TCAAATGAAGATAGA C	68	8237	8252	404
848933	N/A	N/A	GAATACCCAGTCCCC T	49	8548	8563	405
848949	N/A	N/A	CTCAAGGGAAAGGCC T	59	9043	9058	406
848965	N/A	N/A	CATGGCAGCGGTGAA C	47	9638	9653	407
848981	N/A	N/A	GATCAAACCTGTCCC C	42	10427	10442	408
848997	N/A	N/A	TGCAGACCGTTTCC A	83	11221	11236	409

## 042765

849013	N/A	N/A	GGAAAGGAACAGGCT C	88	11844	11859	410
849029	N/A	N/A	TTGAGGGCGGCAGC C	32	12687	12702	411
849045	N/A	N/A	TGCTGGATACACAGG C	79	13112	13127	412
849061	N/A	N/A	TGTACCTGGGTTCTG C	86	13885	13900	413
849077	N/A	N/A	CACTAGATATTGAGC T	55	14329	14344	414
849093	N/A	N/A	CTATGCTAGTAGGTC T	51	14678	14693	415
849109	N/A	N/A	GGCCAAAGGAAGACT T	22	15402	15417	416
849125	N/A	N/A	CTGCAAGAAAGACAA C	73	15889	15904	417
848320	887	902	CACCAGGCTGCCTCC G	49	16279	16294	418
848335	985	1000	CCGTCCTCCTCGGGC A	81	16377	16392	419
849141	N/A	N/A	CATCAGACGGCCGTG C	40	16416	16431	420
848349	1019	1034	GTCACACTTGCTGGC C	62	16649	16664	421
468459	1063	1078	GCATCCCGGCCGCTG A	76	16693	16708	422
468460	1075	1090	TTGGCCACGCCGGCA T	46	16705	16720	48
848380	1091	1106	GCGCATGCTGGCACC C	45	16721	16736	423

## 042765

849157	N/A	N/A	GATAACATAACAAAA G	29	17096	17111	424
849173	N/A	N/A	GCAGAAGGTTATTGA T	64	17736	17751	425
849189	N/A	N/A	ACAGCTGCTAGTTAT T	96	18085	18100	426
					18398	18413	
849205	N/A	N/A	TGCTACTGTCAACAG T	86	19032	19047	427
849221	N/A	N/A	CAATAACCTTATTAT C	6	19402	19417	428
849237	N/A	N/A	AGAGAACAGACTGAG G	83	19727	19742	429
848396	1170	1185	GGCTTTTCCGAATAA A	43	20001	20016	430
849253	N/A	N/A	GGCAGAGGACGCAG GG	40	20538	20553	431
849269	N/A	N/A	ACTATTCGGTGTATC A	82	21050	21065	432
848428	1466	1481	GCTGGAGGCACCAAT G	0	21438	21453	433
849285	N/A	N/A	GTCTTATCGGCCAGG T	86	21811	21826	434
848444	1617	1632	TGACATCTTTGGCAG A	39	22110	22125	435
848460	1731	1746	ACCATACAGTCCTGC A	19	22513	22528	436
848476	1814	1829	GAAACTGGAGCAGCT C	54	22596	22611	437
849301	N/A	N/A	CATTGAAAATCCATC C	83	22895	22910	438

## 042765

849317	N/A	N/A	CCCAAGGAAGACTGT T	56	23318	23333	439
848490	1977	1992	CCTCAGCTGGTGGAG C	54	23597	23612	440
848506	2007	2022	GGTGGCAGTGGACAC G	46	23627	23642	441
849333	N/A	N/A	AGGTAATACCTTTTC	51	23871	23886	442
849349	N/A	N/A	CACCATCCCTTGATG C	46	24285	24300	443
849365	N/A	N/A	GAAAACACCATCTTT C	26	25118	25133	444
849381	N/A	N/A	GGCGGTATGGTGGTG G	71	25632	25647	445
849397	N/A	N/A	ACCCAGGGCAAGTGG A	56	26369	26384	446
849413	N/A	N/A	CCCCACCCACACTTC A	53	27304	27319	447
848522	2227	2242	TCGCAGGCCACGGTC A	69	27370	27385	448
848538	2485	2500	TTTAAAGCTCAGCC C	38	27628	27643	449
848554	2565	2580	AGCAGCCCCGAAAG G	67	27708	27723	450
848570	2706	2721	ACCCGAGCACAGCTC G	90	27849	27864	451
848585	2741	2756	CCACGGACATCGGCA C	93	27884	27899	452
848601	2777	2792	TGGCACGGAACAAGA G	54	27920	27935	453

848617	2898	2913	GGCCATCAGCACCTT T	63	28041	28056	454
848632	2976	2991	CTAGATGCCATCCAG A	91	28119	28134	455
848647	3088	3103	GGCCACCTTTGGGTG T	46	28231	28246	456
848663	3141	3156	GTGCATGCACCACTG C	78	28284	28299	457
848679	3221	3236	CTGGTTCAGGTTTCT	88	28364	28379	458
848694	3254	3269	TCCTGCTGTGTGAGC T	91	28397	28412	459
848710	3302	3317	GAAGAGGCTTGCTT C	17	28445	28460	460
848726	3381	3396	ACCGAGCTTCCTGGT C	38	28524	28539	461
848742	3438	3453	GGCCTGGGTGATAAC G	26	28581	28596	462
848757	3550	3565	CCAAAAGATAAATGT C	46	28693	28708	463
848773	3638	3653	TACAAAACCCAGAAT A	59	28781	28796	464
848305	758	773	CAACTCAAGGCCAG C	79	N/A	N/A	465
848412	1349	1364	GATGACCTCGGGAGC T	38	N/A	N/A	466

## Исследование 3.

Культивируемые клетки HepG2 при плотности 20000 клеток на лунку трансфицировали путем электропорации с помощью 1000 нМ антисмыслового олигонуклеотида. После периода обработки, составлявшего примерно 24 ч, РНК выделяли из клеток и измеряли уровни mRNA PCSK9 с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Для измерения уровней mRNA использовали набор праймеров и зондов для PCSK9 человека от ABI (ID № Hs03037355\_m1). Уровни mRNA PCSK9 корректировали в соответствии с общим содержанием РНК, измеренным с помощью RIBOGREEN®. Результаты представлены в виде процента подавления PCSK9 по сравнению с необработанными контрольными клетками.

Таблица 7

Подавление mRNA PCSK9 с помощью сEt-гэпмеров 3-10-3, нацеливающих на SEQ ID NO: 1 и 2

№ ISIS	SEQ ID: 1, стартовый сайт	SEQ ID: 1, стоп- сайт	Последовательность	% подавления	SEQ ID: 2, стартовый сайт	SEQ ID 2: стоп- сайт	SEQ ID NO
848205	4	19	CACCAGAGCCCCAT CG	3	3479	3494	467
848221	189	204	CTGGGAGCCGCTGC TG	42	3664	3679	468
848237	389	404	TGGCAGCGGCCACC AG	0	3864	3879	469
848253	506	521	GGCCAGGCCGTCCT CC	51	3981	3996	470
848778	N/A	N/A	CCGCACCTTGGCGC AG	0	4035	4050	471
848794	N/A	N/A	GAAACAGATGGAA TAC	28	4626	4641	472
848810	N/A	N/A	ACCCAGCACACTCA GA	0	5291	5306	473
848826	N/A	N/A	GTACTCTGTGCAGT GG	80	5748	5763	474
848842	N/A	N/A	GAGTAGAACAGAG TCC	54	6544	6559	475

## 042765

848858	N/A	N/A	TTAATAATCAGCCT TC	46	6933	6948	476
848874	N/A	N/A	TACAAATGCAGGCA GA	40	7256	7271	477
848890	N/A	N/A	CTCGACAACAGGTT TT	65	7577	7592	478
848906	N/A	N/A	AGGAACATGATGA CAT	0	7811	7826	479
848268	644	659	CTGCAGGCGGCGG GCA	0	7917	7932	480
848279	679	694	ATCTTGGTGAGGTA TC	40	7952	7967	481
848294	695	710	ATGGAAGACATGC AGG	44	7968	7983	482
848922	N/A	N/A	TAAAATGACTCAGG CT	19	8406	8421	483
848938	N/A	N/A	CATCAAGTTAGAGG CC	49	8650	8665	484
848954	N/A	N/A	TATACGGGTACCTT CT	28	9143	9158	485
848970	N/A	N/A	GCTCAGTGCAAAC GC	0	10094	10109	486
848309	779	794	CTCGATGTAGTCGA CA	62	10540	10555	487
848986	N/A	N/A	CCCGAGAAGTGGGA AAC	12	10729	10744	488
849002	N/A	N/A	CCAAGATCCCACGA GA	56	11458	11473	489
849018	N/A	N/A	GAGAAAGTGGTCCT GC	35	12122	12137	490

## 042765

849034	N/A	N/A	CAGCAATAACTGAT TT	42	12825	12840	491
849044	N/A	N/A	GGATACACAGGCTC GC	83	13108	13123	337
849050	N/A	N/A	CGCCTGAGAAGCTC AG	44	13353	13368	492
849066	N/A	N/A	CCACACAACGCACA TC	15	14043	14058	493
849082	N/A	N/A	GACCAAACAGTGCT CG	28	14360	14375	494
849098	N/A	N/A	CTACAAAGACCTTT TC	0	14849	14864	495
849114	N/A	N/A	TAGGAGAAAGTAG GGA	26	15533	15548	496
849130	N/A	N/A	GAATATCAATATCT AA	19	15983	15998	497
848325	931	946	TCCCGGTGGTCACT CT	2	16323	16338	498
848340	990	1005	GGGTCCCGTCCTCC TC	38	16382	16397	499
849146	N/A	N/A	CCACATGAGAAAG ACC	0	16614	16629	500
848354	1026	1041	CATGACTGTCACAC TT	23	16656	16671	501
848369	1074	1089	TGGCCACGCCGGCA TC	17	16704	16719	502
468460	1075	1090	TTGGCCACGCCGGC AT	4	16705	16720	48
848385	1114	1129	TGGCAGTTGAGCAC GC	0	16744	16759	503

## 042765

849162	N/A	N/A	GTCTAGAAAAAGTC CT	65	17257	17272	504
849178	N/A	N/A	CCGTGCCAGGTCAT GC	78	17957	17972	505
849194	N/A	N/A	CTGGGATACAGACA CC	42	18254	18269	506
849210	N/A	N/A	AATTAAGACTCC AT	18	19154	19169	507
849226	N/A	N/A	TATTAGCAATTACA CC	45	19502	19517	508
849242	N/A	N/A	TTACAGGCACAGAG TG	25	19914	19929	509
848401	1228	1243	CTGTACCCACCCGC CA	11	20059	20074	510
849258	N/A	N/A	AACAAGATTCCTTC CC	30	20814	20829	511
849274	N/A	N/A	GGCAGAACTCTGGC AC	56	21163	21178	512
848417	1402	1417	CCCAAAGTCCCAG GG	0	21374	21389	513
849290	N/A	N/A	GGTGAAAGATGGT GAT	10	22003	22018	514
848433	1544	1559	CATCATGGCTGCAA TG	0	22037	22052	515
848449	1636	1651	GGGAACCAGGCCTC AT	25	22129	22144	516
848465	1736	1751	TGCTGACCATACAG TC	0	22518	22533	517
849306	N/A	N/A	GTGCACTATCCTGT AG	28	23065	23080	518

## 042765

849322	N/A	N/A	CAAAGACGAAAAT GGG	44	23462	23477	519
848481	1925	1940	GCACCTGGCAATGG CG	34	23545	23560	520
848495	1993	2008	CGGGTCCCCATGCT GG	0	23613	23628	521
849338	N/A	N/A	TGCTTAGCACTCAT CA	0	24102	24117	522
849354	N/A	N/A	CCTACATGCCAGCC TG	73	24472	24487	523
849370	N/A	N/A	AAAGAGATGCTGG CCT	28	25228	25243	524
848511	2082	2097	GCACAGGCGGCTTG TG	28	25413	25428	525
849386	N/A	N/A	CCATATTTATGCAC AT	62	25806	25821	526
849402	N/A	N/A	TTTCAGTACTCTAT AT	12	26511	26526	527
848527	2372	2387	AACGGCTGTCACGG CC	42	27515	27530	528
848543	2507	2522	AGAGAGGGACAAG TCG	47	27650	27665	529
848559	2603	2618	TTCCAGGCAAGGAG GC	23	27746	27761	530
848575	2712	2727	GGCAGCACCCGAG CAC	72	27855	27870	531
848590	2757	2772	ATAAAAGTCATTCT GC	15	27900	27915	532
848606	2787	2802	ATTGAATGCCTGGC AC	36	27930	27945	533

## 042765

848622	2919	2934	CCACAGTTAGCTGG AG	45	28062	28077	534
848637	3036	3051	GCTCAGGAAACCA AGG	12	28179	28194	535
848652	3122	3137	CTGCCGAGTCAGTC CT	66	28265	28280	536
848668	3172	3187	TGCCGGGTAGTGGA GC	49	28315	28330	537
848683	3226	3241	CCCCTCTGGTTCCA GG	43	28369	28384	538
848699	3261	3276	GCTCAGTTCCTGCT GT	18	28404	28419	539
848715	3317	3332	AGCCGGGTGAAGT AAG	26	28460	28475	540
848731	3386	3401	CACTCACCGAGCTT CC	73	28529	28544	541
848747	3471	3486	CCTTAGAAGCATCT CC	52	28614	28629	542
848762	3576	3591	GTAAAAAGGCAAC AGA	36	28719	28734	543

Таблица 8

Подавление mRNA PCSK9 с помощью сЕт-гэпмеров 3-10-3, нацеливающих на SEQ ID NO: 1 и 2

№ ISIS	SEQ ID: 1, стартовый сайт	SEQ ID: 1, стоп-сайт	Последовательность	% подавления	SEQ ID: 2, стартовый сайт	SEQ ID 2: стоп-сайт	SEQ ID NO
848206	7	22	CGCCACCAGAGC CCCA	30	3482	3497	544
848222	207	222	CGGAATCCTGGC TGGG	55	3682	3697	545
848238	476	491	TAGCACCAGCTC CTCG	53	3951	3966	546
848254	520	535	TGCTCGGGTGCTT CGG	35	3995	4010	547
848779	N/A	N/A	GGCTGCGGGTTC GCCC	13	4070	4085	548
848795	N/A	N/A	CGAGAATACCTC CGCC	73	4682	4697	549
848811	N/A	N/A	GCTGAGTAAGGA CTTG	64	5317	5332	550
848827	N/A	N/A	TTCCGCTAAATAA AAA	9	5781	5796	551
848843	N/A	N/A	TCAGAGTAGAAC AGAG	51	6547	6562	552
848859	N/A	N/A	GAGGGAGGTGCC AAGC	31	6954	6969	553
848875	N/A	N/A	CTACAAATGCAG GCAG	63	7257	7272	554
848891	N/A	N/A	AACTACGGGCCA CACT	7	7591	7606	555
848907	N/A	N/A	ACGGATCCTGGC CCCA	45	7834	7849	556
848269	663	678	CCCGGCGGGCAG CCTG	18	7936	7951	557
848280	680	695	GATCTTGGTGAG GTAT	1	7953	7968	558

## 042765

848295	699	714	GGCCATGGAAGA CATG	18	7972	7987	559
848923	N/A	N/A	CTAGAGTCATGCT TTT	0	8425	8440	560
848939	N/A	N/A	GTGGAGAATCAG TG TG	40	8683	8698	561
848955	N/A	N/A	TTGAAGTCCAGCT CTC	16	9258	9273	562
848971	N/A	N/A	GCAATTCGGTTTG TCC	65	10140	1015 5	563
848310	795	810	AGACAGAGGAGT CCTC	31	10556	1057 1	564
848987	N/A	N/A	GATCATTTAAGG CAAG	26	10850	1086 5	565
849003	N/A	N/A	TCCCAAGATCCC ACGA	5	11460	1147 5	566
849019	N/A	N/A	CAAGAGAAGCTT CTCC	20	12152	1216 7	567
849035	N/A	N/A	CTACAGCAATAA CTGA	46	12828	1284 3	568
849044	N/A	N/A	GGATACACAGGC TCGC	78	13108	1312 3	337
849051	N/A	N/A	GAGCAGGGAGCT CATT	0	13395	1341 0	569
849067	N/A	N/A	CTAGAAGACAGC ACAG	15	14085	1410 0	570
849083	N/A	N/A	CCGACCTGAAGA CATC	41	14380	1439 5	571
849099	N/A	N/A	GCCCACCGCATA ATCC	18	14897	1491 2	572

## 042765

849115	N/A	N/A	GACAAAGGTTAG GGTA	46	15549	1556 4	573
849131	N/A	N/A	TGAATATCAATAT CTA	30	15984	1599 9	574
848326	939	954	CCTCGATTTCCCG GTG	30	16331	1634 6	575
848341	992	1007	GCGGGTCCCGTC CTCC	0	16384	1639 9	576
849147	N/A	N/A	GACCACATGAGA AAGA	0	16616	1663 1	577
848355	1029	1044	TGCCATGACTGTC ACA	35	16659	1667 4	578
468460	1075	1090	TTGGCCACGCCG GCAT	19	16705	1672 0	48
848370	1076	1091	CTTGGCCACGCC GGCA	0	16706	1672 1	579
848386	1133	1148	GCTAACCGTGCC CTTC	20	16763	1677 8	580
849163	N/A	N/A	CAGTAAGGGAGA GAAC	3	17363	1737 8	581
849179	N/A	N/A	CCCGTGCCAGGT CATG	38	17958	1797 3	582
849195	N/A	N/A	AGCTGCTAGTTAT TTA	44	18396	1841 1	583
849211	N/A	N/A	GAAACAGGGACA GTTG	25	19189	1920 4	584
849227	N/A	N/A	GGAAGATATTAG CAAT	78	19508	1952 3	585
849243	N/A	N/A	CTTACAGGCACA GAGT	27	19915	1993 0	586

## 042765

848402	1238	1253	GAGGACGCGGCT GTAC	25	20069	2008 4	587
849259	N/A	N/A	GTGGAACAAGAT TCCT	40	20818	2083 3	588
849275	N/A	N/A	AGGCAGAACTCT GGCA	56	21164	2117 9	589
848418	1414	1429	CCAAAGTTGGTC CCCA	0	21386	2140 1	590
848434	1546	1561	AGCATCATGGCT GCAA	49	22039	2205 4	591
848450	1641	1656	CCTCAGGGAACC AGGC	28	22134	2214 9	592
849291	N/A	N/A	TGCCATCCTGCTT ACC	30	22209	2222 4	593
848466	1738	1753	TGTGCTGACCATA CAG	20	22520	2253 5	594
849307	N/A	N/A	CACCAAAATGCT GCAA	39	23094	2310 9	595
849323	N/A	N/A	GGCCTTAGAGTC AAAG	0	23473	2348 8	596
468479	1926	1941	AGCACCTGGCAA TGGC	47	23546	2356 1	597
848496	1997	2012	GACACGGGTCCC CATG	28	23617	2363 2	598
849339	N/A	N/A	ACTAAGCTAAGT GCTT	7	24113	2412 8	599
849355	N/A	N/A	GCAAAAATGGTGC TCTT	52	24690	2470 5	600
849371	N/A	N/A	ACCTAGAAACAA CTCA	23	25251	2526 6	601

## 042765

848512	2084	2099	CAGCACAGGCGG CTTG	14	25415	2543 0	602
849387	N/A	N/A	ATGCATATTGCAT TTC	44	25828	2584 3	603
849403	N/A	N/A	GGCCAGACCACA CTCC	13	26808	2682 3	604
848528	2375	2390	GGCAACGGCTGT CACG	52	27518	2753 3	605
848544	2509	2524	TGAGAGAGGGAC AAGT	27	27652	2766 7	606
848560	2613	2628	AGTGAGTGAGTT CCAG	65	27756	2777 1	607
848576	2713	2728	TGGCAGCACCCG AGCA	56	27856	2787 1	608
848591	2761	2776	CTCAATAAAAAGT CATT	45	27904	2791 9	609
848607	2791	2806	GAGGATTGAATG CCTG	37	27934	2794 9	610
848623	2921	2936	CTCCACAGTTAGC TGG	35	28064	2807 9	611
848638	3045	3060	GTAAAGGTGGCT CAGG	46	28188	2820 3	612
848653	3123	3138	ACTGCCGAGTCA GTCC	29	28266	2828 1	613
848669	3180	3195	GTGTACCCTGCCG GGT	3	28323	2833 8	614
848684	3227	3242	CCCCCTCTGGTTC CAG	54	28370	2838 5	615
848700	3263	3278	TGGCTCAGTTCCT GCT	36	28406	2842 1	616
848716	3321	3336	GCCCAGCCGGGT GAAG	26	28464	2847 9	617
848732	3388	3403	ATCACTCACCGA GCTT	69	28531	2854 6	618
848748	3473	3488	TGCCTTAGAAGC ATCT	68	28616	2863 1	619
848763	3578	3593	CTGTAAAAAGGC AACA	52	28721	2873 6	620

Таблица 9

Подавление mRNA PCSK9 с помощью сЕt-гэпмеров 3-10-3, нацеливающихся на SEQ ID NO: 1 и 2

№ ISIS	SEQ ID: 1, стартовый сайт	SEQ ID: 1, стоп-сайт	Последовательность	% подавления	SEQ ID: 2, стартовый сайт	SEQ ID 2: стоп-сайт	SEQ ID NO
848207	12	27	GATCACGCCACC AGAG	0	3487	3502	621
848223	209	224	CGCGGAATCCTG GCTG	1	3684	3699	622
848239	477	492	CTAGCACCAGCT CCTC	38	3952	3967	623
848255	533	548	GGCTGTGGTTCC GTGC	29	4008	4023	624
848780	N/A	N/A	AAACAGCACCGC ACCG	0	4090	4105	625
848796	N/A	N/A	CCGCACACGGTC GGCA	35	4821	4836	626

## 042765

8488 12	N/A	N/A	GAACAAGGAAGA GGGC	39	5341	5356	627
8488 28	N/A	N/A	CAAAGACCCATC TGAA	32	5803	5818	628
8488 44	N/A	N/A	TCATGAATCAAG TCCA	71	6650	6665	629
8488 60	N/A	N/A	GCAGAGATCAAT CACA	36	6997	7012	630
8488 76	N/A	N/A	TCCCATCCAGAT GCTC	34	7272	7287	631
8488 92	N/A	N/A	ATTCAGGCAAAA ATGG	12	7608	7623	632
8482 70	665	680	TCCCCGGCGGGC AGCC	24	7938	7953	633
8482 81	681	696	GGATCTTGGTGA GGTA	23	7954	7969	634
8482 96	704	719	AAGAAGGCCATG GAAG	38	7977	7992	635
8489 08	N/A	N/A	TGCCATTCCCAA AAAG	0	8045	8060	636
8489 24	N/A	N/A	CAAAGGAATTTT GGAC	0	8442	8457	637
8489 40	N/A	N/A	TGCCATGTGGAG AATC	24	8689	8704	638
8489 56	N/A	N/A	TCGAACCCAGGC TGGT	0	9286	9301	639
8489 72	N/A	N/A	CATGACATAACA GCAC	24	10158	10173	640
8483 11	797	812	AAAGACAGAGGA GTCC	28	10558	10573	641

## 042765

8489 88	N/A	N/A	AAAGAGGATCAT TTAA	0	10856	1087 1	642
8490 04	N/A	N/A	CAAGAACGACAA AGCT	48	11493	1150 8	643
8490 20	N/A	N/A	GGACACGGAAGA GGCA	63	12166	1218 1	644
8490 36	N/A	N/A	ACAGAGAAATGC ATGC	66	12843	1285 8	645
8490 44	N/A	N/A	GGATACACAGGC TCGC	81	13108	1312 3	337
8490 52	N/A	N/A	CTCTATCTTCCAA ACC	22	13578	1359 3	646
8490 68	N/A	N/A	ATACAGGCTTAT CTAG	3	14097	1411 2	647
8490 84	N/A	N/A	CAATAGGCATCT ACCA	59	14444	1445 9	648
8491 00	N/A	N/A	AGGACTTACAGC CCAC	12	14907	1492 2	649
8491 16	N/A	N/A	GCCCATGCAGGA CAAA	11	15559	1557 4	650
8491 32	N/A	N/A	TATGAATATCAA TATC	0	15986	1600 1	651
4684 53	950	965	CATGACCCTGCC CTCG	45	16342	1635 7	652
8483 42	995	1010	GAAGCGGGTCCC GTCC	17	16387	1640 2	653
8491 48	N/A	N/A	ACACAAGGACCA CATG	0	16623	1663 8	654
8483 56	1040	1055	TGCCAGGTGGGT GCCA	26	16670	1668 5	655

## 042765

4684 60	1075	1090	TTGGCCACGCCG GCAT	0	16705	1672 0	48
8483 71	1077	1092	CCTTGCCACGC CGGC	37	16707	1672 2	656
8483 87	1135	1150	CCGCTAACCGTG CCCT	17	16765	1678 0	657
8491 64	N/A	N/A	CTTGAGCTGTGC GACC	27	17497	1751 2	658
8491 80	N/A	N/A	CCCCGTGCCAGG TCAT	26	17959	1797 4	659
8491 96	N/A	N/A	ACAACAGCCACA TTTA	56	18413	1842 8	660
8492 12	N/A	N/A	TGTGAAACAGGG ACAG	17	19192	1920 7	661
8492 28	N/A	N/A	TAATATATACATC CTA	0	19564	1957 9	662
8492 44	N/A	N/A	CCTTACAGGCAC AGAG	16	19916	1993 1	663
8484 03	1241	1256	GTTGAGGACGCG GCTG	19	20072	2008 7	664
8492 60	N/A	N/A	CCAACGCGCGCG CGCG	4	20870	2088 5	665
8492 76	N/A	N/A	GAAAATCTGACT GCCC	43	21180	2119 5	666
8484 19	1416	1431	GGCCAAAGTTGG TCCC	0	21388	2140 3	667
8484 35	1550	1565	AGACAGCATCAT GGCT	43	22043	2205 8	668
8484 51	1656	1671	TCAGTACCCGCT GGTC	41	22149	2216 4	669

## 042765

8492 92	N/A	N/A	GGTCACACAGAC CTCC	24	22252	2226 7	670
8484 67	1744	1759	CCCGAGTGTGCT GACC	39	22526	2254 1	671
8493 08	N/A	N/A	TTCCACCAAAT GCTG	7	23097	2311 2	672
8484 82	1927	1942	CAGCACCTGGCA ATGG	10	23547	2356 2	673
8484 97	1998	2013	GGACACGGGTCC CCAT	32	23618	2363 3	674
8493 24	N/A	N/A	GGCAAGCCCAGC CTCC	0	23667	2368 2	675
8493 40	N/A	N/A	AACGATAGCTAG AATT	12	24143	2415 8	676
8493 56	N/A	N/A	TGGTAGGGTTGT GGTT	0	24782	2479 7	677
8493 72	N/A	N/A	GCAAGAGCTAGG AAAC	60	25265	2528 0	678
8485 13	2086	2101	CTCAGCACAGGC GGCT	41	25417	2543 2	679
8493 88	N/A	N/A	ATGCATGCATATT GCA	0	25832	2584 7	680
8494 04	N/A	N/A	CTTCAGACTCCA GCCT	0	26944	2695 9	681
8485 29	2378	2393	GATGGCAACGGC TGTC	0	27521	2753 6	682
8485 45	2511	2526	GCTGAGAGAGGG ACAA	54	27654	2766 9	683
8485 61	2617	2632	CCAGAGTGAGTG AGTT	30	27760	2777 5	684

## 042765

8485 77	2714	2729	CTGGCAGCACCC GAGC	52	27857	2787 2	685
8485 92	2762	2777	GCTCAATAAAAAG TCAT	44	27905	2792 0	686
8486 08	2795	2810	ACCTGAGGATTG AATG	16	27938	2795 3	687
8486 24	2944	2959	AATCAGGGAGCC CCCA	0	28087	2810 2	688
8486 39	3047	3062	GAGTAAAGGTGG CTCA	19	28190	2820 5	689
8486 54	3124	3139	CACTGCCGAGTC AGTC	51	28267	2828 2	690
8486 70	3186	3201	GCGAATGTGTAC CCTG	81	28329	2834 4	691
8486 85	3229	3244	CGCCCCCTCTGGT TCC	57	28372	2838 7	692
8487 01	3264	3279	CTGGCTCAGTTCC TGC	69	28407	2842 2	693
8487 17	3330	3345	AAATGAGGAGCC CAGC	42	28473	2848 8	694
8487 33	3392	3407	TGCCATCACTCAC CGA	48	28535	2855 0	695
8487 49	3482	3497	CCCCGACCATGC CTTA	43	28625	2864 0	696
8487 64	3580	3595	GGCTGTAAAAAG GCAA	68	28723	2873 8	697

Таблица 10

Подавление mRNA PCSK9 с помощью сEt-гэпмеров 3-10-3, нацеливающихся на SEQ ID NO: 1 и 2

№ ISIS	SEQ ID: 1, стартовый сайт	SEQ ID: 1, стоп-сайт	Последовательность	% подавления	SEQ ID: 2, стартовый сайт	SEQ ID 2: стоп-сайт	SEQ ID NO
848208	15	30	GCAGATCACGCCA CCA	0	3490	3505	698
848224	212	227	GCGCGCGGAATCC TGG	21	3687	3702	699
848240	478	493	GCTAGCACCAGCT CCT	37	3953	3968	700
468441	541	556	TGGAAGGTGGCTG TGG	0	4016	4031	701
848781	N/A	N/A	CCGAGAGGAAACA GCA	52	4098	4113	702
848797	N/A	N/A	AGCAAACCTCGCCC CGC	55	4833	4848	703
848813	N/A	N/A	GGCTCAGGGAACA AGG	39	5349	5364	704
848829	N/A	N/A	CACCATCATCGCT GAA	39	5834	5849	705
848845	N/A	N/A	GCAGACATACCTG CTT	24	6693	6708	706
848861	N/A	N/A	CTACATGTGCAGA GAT	52	7005	7020	707
848877	N/A	N/A	ATAAATCTCCCATC CA	36	7279	7294	708
848893	N/A	N/A	TTTCAAATGTGCCA TT	22	7621	7636	709

## 042765

4684 43	666	681	ATCCCCGGCGGGC AGC	52	7939	7954	710
8482 82	682	697	AGGATCTTGGTGA GGT	47	7955	7970	711
8482 97	732	747	CGCCACTCATCTTC AC	23	8005	8020	712
8489 09	N/A	N/A	GGCCTACTAAGCA CAG	49	8100	8115	713
8489 25	N/A	N/A	TTCAAAGGAATTT GG	0	8444	8459	714
8489 41	N/A	N/A	ACCCAGGTCCAGA CTC	44	8793	8808	715
8489 57	N/A	N/A	GGTTAGACAGCCA ATA	48	9318	9333	716
8489 73	N/A	N/A	CTAAATCATGACA TAA	14	10164	10179	717
8483 12	799	814	GCAAAGACAGAGG AGT	46	10560	10575	718
8489 89	N/A	N/A	TCCAAGGTAAGTG CAG	52	10924	10939	719
8490 05	N/A	N/A	GACAAGAACGACA AAG	46	11495	11510	720
8490 21	N/A	N/A	GACAATGAAGAGG AGA	69	12240	12255	721
8490 37	N/A	N/A	CTCAATACCTGAC AGA	50	12854	12869	722
8490 44	N/A	N/A	GGATACACAGGCT CGC	81	13108	13123	337
8490 53	N/A	N/A	TGGTAAAAGCCCC CAC	39	13677	13692	723

## 042765

8490 69	N/A	N/A	ATACATTGGCAGA CAG	56	14121	1413 6	724
8490 85	N/A	N/A	ACTCATCAATAGG CAT	79	14450	1446 5	725
8491 01	N/A	N/A	CATCACAGGACTT ACA	0	14913	1492 8	726
8491 17	N/A	N/A	CAAGAGACTCACT GGG	16	15581	1559 6	727
8491 33	N/A	N/A	TGCCAAGAAGGAC CCA	61	16020	1603 5	728
8483 27	953	968	GACCATGACCCTG CCC	41	16345	1636 0	729
8483 43	997	1012	TGGAAGCGGGTCC CGT	11	16389	1640 4	730
8491 49	N/A	N/A	TGCTCGACGAACA CAA	0	16633	1664 8	731
8483 57	1053	1068	CGCTGACCACCCC TGC	33	16683	1669 8	732
4684 60	1075	1090	TTGGCCACGCCGG CAT	7	16705	1672 0	48
8483 72	1078	1093	CCCTTGGCCACGC CGG	49	16708	1672 3	733
8483 88	1137	1152	TGCCGCTAACCGT GCC	10	16767	1678 2	734
8491 65	N/A	N/A	GTGGAAGTCAAGC TGC	42	17550	1756 5	735
8491 81	N/A	N/A	GCCCCGTGCCAGG TCA	58	17960	1797 5	736
8491 97	N/A	N/A	TAGGAGACAGCTA GTG	25	18486	1850 1	737

## 042765

8492 13	N/A	N/A	CACAACTTGAAC AGA	38	19248	1926 3	738
8492 29	N/A	N/A	CTTAATATATACAT CC	0	19566	1958 1	739
8492 45	N/A	N/A	GCCAAGGTCACCC CTT	0	19963	1997 8	740
8484 04	1283	1298	GACCAGCACGACC CCA	13	20114	2012 9	741
8492 61	N/A	N/A	ACCTAGGTTACCG CTG	33	20918	2093 3	742
8492 77	N/A	N/A	AGGAAAATCTGAC TGC	26	21182	2119 7	743
8484 20	1423	1438	ACACAGCGGCCAA AGT	0	21395	2141 0	744
8484 36	1552	1567	GCAGACAGCATCA TGG	76	22045	2206 0	745
8484 52	1658	1673	GGTCAGTACCCGC TGG	29	22151	2216 6	746
8492 93	N/A	N/A	CCTATTTAAGGTG GCG	51	22311	2232 6	747
8484 68	1753	1768	CGTGTAGGCCCCG AGT	44	22535	2255 0	748
8493 09	N/A	N/A	CAGAAATGCCTGC CCC	64	23141	2315 6	749
8484 83	1928	1943	GCAGCACCTGGCA ATG	0	23548	2356 3	750
8484 98	1999	2014	TGGACACGGTCC CCA	2	23619	2363 4	751
8493 25	N/A	N/A	CCTCACCCAGGG CAA	0	23678	2369 3	752

## 042765

8493 41	N/A	N/A	GTAACGATAGCTA GAA	52	24145	2416 0	753
8493 57	N/A	N/A	TGAACATGGTAGG GTT	62	24788	2480 3	754
8493 73	N/A	N/A	AGGCAAGAGCTAG GAA	51	25267	2528 2	755
8485 14	2113	2128	ACGCACTGGTTGG GCT	5	25444	2545 9	756
8493 89	N/A	N/A	GTAAATAGATCA GAG	15	25989	2600 4	757
8494 05	N/A	N/A	CCCCATAGCCTGC CCC	0	27058	2707 3	758
8485 30	2381	2396	GCAGATGGCAACG GCT	14	27524	2753 9	759
8485 46	2520	2535	CCATGGAGGGCTG AGA	3	27663	2767 8	760
8485 62	2619	2634	ACCCAGAGTGAGT GAG	29	27762	2777 7	761
8485 78	2715	2730	GCTGGCAGCACCC GAG	18	27858	2787 3	762
8485 93	2763	2778	AGCTCAATAAAAG TCA	61	27906	2792 1	763
8486 09	2820	2835	GAAGAATCCTGCC TCC	42	27963	2797 8	764
8486 25	2946	2961	TTAATCAGGGAGC CCC	31	28089	2810 4	765
8486 40	3050	3065	GCAGAGTAAAGGT GGC	38	28193	2820 8	766
8486 55	3125	3140	ACACTGCCGAGTC AGT	32	28268	2828 3	767
8486 71	3188	3203	GTGCGAATGTGTA CCC	68	28331	2834 6	768
8486 86	3237	3252	GGCAGGCACGCC CCT	17	28380	2839 5	769
8487 02	3265	3280	TCTGGCTCAGTTCC TG	51	28408	2842 3	770
8487 18	3332	3347	AAAAATGAGGAGC CCA	17	28475	2849 0	771
8487 34	3415	3430	TTCCATGCCTGCAG GC	35	28558	2857 3	772
8487 50	3502	3517	GGACAGTTGTTGG CCC	25	28645	2866 0	773
8487 65	3588	3603	GAAAAGTTGGCTG TAA	22	28731	2874 6	774

Таблица 11

Подавление mRNA PCSK9 с помощью сЕт-гэпмеров 3-10-3, нацеливающих на SEQ ID NO: 1 и 2

№ ISIS	SEQ ID: 1, стартовый сайт	SEQ ID: 1, стоп- сайт	Последовательность	% подавлени я	SEQ ID: 2, стартовый сайт	SEQ ID 2: стоп- сайт	SEQ ID NO
848209	51	66	ACCTTCTAGGGTGT GG	0	3526	3541	775
848225	242	257	CTGAAGTTCAGGA GCA	35	3717	3732	776
848241	479	494	GGCTAGCACCAGCT CC	58	3954	3969	777
848256	549	564	CGCAGCGGTGGAA GGT	15	4024	4039	778
848782	N/A	N/A	GCGAAGAGCCCTC GGC	33	4158	4173	779
848798	N/A	N/A	GGGAAGAAGCTTC CCA	0	4882	4897	780
848814	N/A	N/A	AGAAAGTCAAAGG CTC	74	5360	5375	781
848830	N/A	N/A	GACACCATCATCGC TG	67	5836	5851	782
848846	N/A	N/A	GGCAGACATACCT GCT	0	6694	6709	783
848862	N/A	N/A	GGCCTTAAGCTGCT TT	10	7048	7063	784
848878	N/A	N/A	ATATAAATCTCCCA TC	9	7281	7296	785
848894	N/A	N/A	TCACATGGTTATAT AA	37	7640	7655	786
848271	667	682	TATCCCCGGCGGGC AG	35	7940	7955	787
848283	683	698	CAGGATCTTGGTGA GG	49	7956	7971	788
848298	740	755	CAGCAGGTCGCCA CTC	5	8013	8028	789
848910	N/A	N/A	AGCAATGGGCCTA CTA	0	8107	8122	790
848926	N/A	N/A	AGCAACAGCTTCA AAG	11	8453	8468	791
848942	N/A	N/A	CTGATTAACCCATG GG	46	8833	8848	792
848958	N/A	N/A	TTACAGATAGAGG AAT	0	9365	9380	793

## 042765

848974	N/A	N/A	GGACATGGAGTGA AGC	7	10200	10215	794
848313	801	816	GGGCAAAGACAGA GGA	11	10562	10577	795
848990	N/A	N/A	GGTAGAGTCACCAT CA	40	10953	10968	796
849006	N/A	N/A	TCTCACAGCAACCT GT	0	11548	11563	797
849022	N/A	N/A	TCCTAACCCCCACA AC	0	12373	12388	798
849038	N/A	N/A	TGCAGGGCTAAAA TCA	34	12880	12895	799
849044	N/A	N/A	GGATACACAGGCT CGC	78	13108	13123	337
849054	N/A	N/A	GGCAGGTGGGCCT GGT	0	13689	13704	800
849070	N/A	N/A	GGATACATTGGCA GAC	41	14123	14138	801
849086	N/A	N/A	GTGTTAGGAGCTTT CA	60	14465	14480	802
849102	N/A	N/A	AGACACATCACAG GAC	27	14918	14933	803
849118	N/A	N/A	AAGAAGCAGGCAC TGG	32	15608	15623	804
849134	N/A	N/A	AAGGAAAGGGAGG CCT	0	16081	16096	805
848328	964	979	TCGAAGTCGGTGAC CA	17	16356	16371	806
848344	999	1014	TGTGGAAGCGGGT CCC	24	16391	16406	807

## 042765

848358	1055	1070	GCCGCTGACCACCC CT	0	16685	16700	808
468460	1075	1090	TTGGCCACGCCGGC AT	30	16705	16720	48
848373	1079	1094	ACCCTTGGCCACGC CG	30	16709	16724	809
848389	1145	1160	TATGAGGGTGCCGC TA	4	16775	16790	810
849150	N/A	N/A	ACTTACCTATGAGG GT	0	16782	16797	811
849166	N/A	N/A	GGCTTACAGTGGA AGT	8	17558	17573	812
849182	N/A	N/A	TGCCCCGTGCCAGG TC	41	17961	17976	813
849198	N/A	N/A	CCAGGAGCCGTGG CCA	12	18537	18552	814
849214	N/A	N/A	ACACAAACTTGAA CAG	10	19249	19264	815
849230	N/A	N/A	TCTTAATATATACA TC	0	19567	19582	816
849246	N/A	N/A	GAACAAAGCCAAG GTC	0	19970	19985	817
848405	1286	1301	GGTGACCAGCACG ACC	0	20117	20132	818
849262	N/A	N/A	CCTTGATAGGCCAG GG	0	20937	20952	819
849278	N/A	N/A	TCCCACTCAAATGT CC	0	21205	21220	820
848421	1425	1440	CCACACAGCGGCC AAA	0	21397	21412	821

## 042765

848437	1554	1569	CGGCAGACAGCAT CAT	72	22047	22062	822
848453	1681	1696	GGCAGGGCGGCCA CCA	0	22174	22189	823
849294	N/A	N/A	AAAAATATTGCACA GCC	0	22353	22368	824
848469	1760	1775	GGCCATCCGTGTAG GC	0	22542	22557	825
849310	N/A	N/A	AGCATTAAGACCCC AT	21	23167	23182	826
848484	1929	1944	GGCAGCACCTGGC AAT	17	23549	23564	827
848499	2000	2015	GTGGACACGGGTC CCC	17	23620	23635	828
849326	N/A	N/A	AGAAAGAGACCCC TCC	0	23692	23707	829
849342	N/A	N/A	AAACAATAGTAAC GAT	0	24153	24168	830
849358	N/A	N/A	TCTGAACATGGTAG GG	58	24790	24805	831
849374	N/A	N/A	GCCCATCCCCATCA GA	6	25303	25318	832
848515	2157	2172	GGGCATGGCAGCA GGA	17	25488	25503	833
849390	N/A	N/A	CTTCAGCATGCAGC TC	6	26093	26108	834
849406	N/A	N/A	TGAAACTGATGGCC CC	22	27070	27085	835
848531	2383	2398	CAGCAGATGGCAA CGG	25	27526	27541	836

## 042765

848547	2522	2537	GGCCATGGAGGGC TGA	0	27665	27680	837
848563	2623	2638	AGGCACCCAGAGT GAG	42	27766	27781	838
848579	2716	2731	AGCTGGCAGCACC CGA	20	27859	27874	839
848594	2770	2785	GAACAAGAGCTCA ATA	13	27913	27928	840
848610	2822	2837	GGGAAGAATCCTG CCT	25	27965	27980	841
848626	2948	2963	CATTAATCAGGGA GCC	21	28091	28106	842
848641	3052	3067	GAGCAGAGTAAAG GTG	23	28195	28210	843
848656	3126	3141	CACACTGCCGAGTC AG	56	28269	28284	844
848672	3213	3228	AGGTTTCTTCCTCT GT	60	28356	28371	845
848687	3243	3258	GAGCTTGGCAGGC ACG	67	28386	28401	846
848703	3266	3281	TTCTGGCTCAGTTC CT	20	28409	28424	847
848719	3334	3349	GTAAAAATGAGGA GCC	29	28477	28492	848
848735	3421	3436	AAAAAGTTCCATGC CT	9	28564	28579	849
848751	3506	3521	GGAGGGACAGTTG TTG	0	28649	28664	850
848766	3590	3605	TAGAAAAGTTGGCT GT	22	28733	28748	851

Таблица 12

Подавление mRNA PCSK9 с помощью сEt-гэпмеров 3-10-3, нацеливающихся на SEQ ID NO: 1 и 2

№ ISIS	SEQ ID: 1, стартовый сайт	SEQ ID: 1, стоп-сайт	Последовательность	% подавления	SEQ ID: 2, стартовый сайт	SEQ ID 2: стоп-сайт	SEQ ID NO
848345	1012	1027	TTGCTGGCCTGTCTGT	3	N/A	N/A	852
848390	1148	1163	GCSTATGAGGGTGCCG	0	N/A	N/A	853
848454	1708	1723	TGCCAACCTGCCCAT	8	N/A	N/A	854
848210	56	71	CGGAAACCTTCTAGGG	0	3531	3546	855
848226	244	259	AGCTGAAGTTCAGGAG	50	3719	3734	856
848242	480	495	AGGCTAGCACCAGCTC	37	3955	3970	857
848257	552	567	TGGCGCAGCGGTGGAA	0	4027	4042	858
848783	N/A	N/A	CCACTACCCGTCTCC	0	4211	4226	859

## 042765

8487 99	N/A	N/A	CGGGAAGAAGCTT CCC	0	4883	4898	860
8488 15	N/A	N/A	CCCCACAACATCC CTC	5	5377	5392	861
8488 31	N/A	N/A	AAAGAAGCTGTGGA CAT	43	5935	5950	862
8488 47	N/A	N/A	AGGCAGACATACC TGC	0	6695	6710	863
8488 63	N/A	N/A	CTGCAAGCTCTCC AGG	17	7095	7110	864
8488 79	N/A	N/A	CAAGAGTGACGGT TAT	45	7295	7310	865
8488 95	N/A	N/A	TATTATTCACATG GTT	41	7646	7661	866
8482 72	668	683	GTATCCCCGGCGG GCA	37	7941	7956	867
8482 84	684	699	GCAGGATCTTGGT GAG	0	7957	7972	868
8482 99	743	758	CTCCAGCAGGTCG CCA	20	8016	8031	869
8489 11	N/A	N/A	ATACATACTTGCT GTC	21	8137	8152	870
8489 27	N/A	N/A	TGGATAGCAACAG CTT	70	8458	8473	871
8489 43	N/A	N/A	TGCTGAGCTGATT AAC	27	8840	8855	872
8489 59	N/A	N/A	AATTATTATAACT GGT	0	9381	9396	873
8489 75	N/A	N/A	GGGCAGGATGGAC ATG	4	10209	10224	874

## 042765

8483 14	817	832	TTCCACGGGATGC TCT	3	10578	1059 3	875
8489 91	N/A	N/A	TTAAAGGATCTGG TCC	31	11011	1102 6	876
8490 07	N/A	N/A	GTGTATGCAAAGT CAC	55	11624	1163 9	877
8490 23	N/A	N/A	AGGGAACAGTGGC TGC	42	12407	1242 2	878
8490 39	N/A	N/A	TTATTGAATGGTA AGA	37	12905	1292 0	879
8490 44	N/A	N/A	GGATACACAGGCT CGC	77	13108	1312 3	337
8490 55	N/A	N/A	CTGCAAGCATGGC CAG	33	13710	1372 5	880
8490 71	N/A	N/A	ACAACTGGATACA TTG	57	14129	1414 4	881
8490 87	N/A	N/A	CACTTTGGTTTCTT CT	28	14560	1457 5	882
8491 03	N/A	N/A	CTTATGGCTTCGGT CA	42	15107	1512 2	883
8491 19	N/A	N/A	AGATACCAGGAGG GCT	48	15730	1574 5	884
8491 35	N/A	N/A	ATAGACAAGGAAA GGG	68	16087	1610 2	885
8483 29	971	986	CACATTCTCGAAG TCG	25	16363	1637 8	886
8483 59	1056	1071	GGCCGCTGACCAC CCC	19	16686	1670 1	887
4684 60	1075	1090	TTGGCCACGCCGG CAT	10	16705	1672 0	48

## 042765

8483 74	1080	1095	CACCCTTGGCCAC GCC	37	16710	1672 5	888
8491 51	N/A	N/A	ATGGAGAGAGACC AGC	20	16811	1682 6	889
8491 67	N/A	N/A	CACCAGAGCCAGT GTT	0	17590	1760 5	890
8491 83	N/A	N/A	CTGCCCCGTGCCA GGT	0	17962	1797 7	891
8491 99	N/A	N/A	TGTCAAATGAGGT GTG	15	18586	1860 1	892
8492 15	N/A	N/A	ATGAGAAGGGCAC ACT	0	19342	1935 7	893
8492 31	N/A	N/A	AACTCTTAATATA TAC	0	19570	1958 5	894
8492 47	N/A	N/A	AGGAACAAAGCCA AGG	31	19972	1998 7	895
8484 06	1293	1308	CGGCAGCGGTGAC CAG	0	20124	2013 9	896
8492 63	N/A	N/A	GCCTTGATAGGCC AGG	33	20938	2095 3	897
8492 79	N/A	N/A	AGAGAAAGGAGCC CAA	0	21290	2130 5	898
8484 22	1427	1442	GTCCACACAGCGG CCA	5	21399	2141 4	899
8484 38	1558	1573	GGCTCGGCAGACA GCA	58	22051	2206 6	900
8492 95	N/A	N/A	GGCTTAAAGAACA TAC	28	22397	2241 2	901
8484 70	1772	1787	GGCGACGGCTGTG GCC	0	22554	2256 9	902

## 042765

8493 11	N/A	N/A	GAGCATTAAGACC CCA	32	23168	2318 3	903
4684 80	1930	1945	AGGCAGCACCTGG CAA	19	23550	2356 5	904
8485 00	2001	2016	AGTGGACACGGGT CCC	56	23621	2363 6	905
8493 27	N/A	N/A	TCACACTTGTGAG GAC	0	23737	2375 2	906
8493 43	N/A	N/A	AAAGCAACGGGTG ATG	0	24170	2418 5	907
8493 59	N/A	N/A	GTAAGATGGAAAG AGA	55	24877	2489 2	908
8493 75	N/A	N/A	CTGGGATGCTCCG TCT	0	25324	2533 9	909
8485 16	2172	2187	TGCATTCCAGACC TGG	6	25503	2551 8	910
8493 91	N/A	N/A	TGCTAACAACCTT CAG	0	26103	2611 8	911
8494 07	N/A	N/A	TACCATGCCAGTG CCA	29	27098	2711 3	912
8485 32	2386	2401	CGGCAGCAGATGG CAA	27	27529	2754 4	913
8485 48	2527	2542	TGCCAGGCCATGG AGG	0	27670	2768 5	914
8485 64	2628	2643	GGAGGAGGCACCC AGA	20	27771	2778 6	915
4684 87	2720	2735	GAGCAGCTGGCAG CAC	42	27863	2787 8	916
8485 95	2771	2786	GGAACAAGAGCTC AAT	47	27914	2792 9	917

## 042765

8486 11	2828	2843	ATCCATGGGAAGA ATC	15	27971	2798 6	918
8486 27	2951	2966	CTCCATTAATCAG GGA	26	28094	2810 9	919
8486 42	3055	3070	ATAGAGCAGAGTA AAG	0	28198	2821 3	920
8486 57	3127	3142	GCACACTGCCGAG TCA	46	28270	2828 5	921
8486 73	3214	3229	CAGGTTTCTTCCTC TG	34	28357	2837 2	922
8486 88	3245	3260	GTGAGCTTGGCAG GCA	70	28388	2840 3	923
8487 04	3267	3282	TTTCTGGCTCAGTT CC	54	28410	2842 5	924
8487 20	3336	3351	CCGTAAAAATGAG GAG	17	28479	2849 4	925
8487 36	3423	3438	GGAAAAAGTTCCA TGC	57	28566	2858 1	926
4685 02	3508	3523	AAGGAGGGACAGT TGT	0	28651	2866 6	927
8487 67	3592	3607	TCTAGAAAAGTTG GCT	39	28735	2875 0	928

Таблица 13

Подавление mRNA PCSK9 с помощью сЕt-гэпмеров 3-10-3, нацеливающих на SEQ ID NO: 1 и 2

№ ISIS	SEQ ID: 1, стартовый сайт	SEQ ID: 2, стоп-сайт	Последовательность	% подавления	SEQ ID: 2, стартовый сайт	SEQ ID 2: стоп-сайт	SEQ ID NO
					вый сайт		
848258	561	576	ACGGATCCTTGGC GCA	38	N/A	N/A	929
848300	753	768	TCAAGGCCAGCTC CAG	23	N/A	N/A	930
848346	1014	1029	ACTTGCTGGCCTG TCT	0	N/A	N/A	931
848391	1154	1169	CTCCAGGCCTATG AGG	0	N/A	N/A	932
848211	58	73	TGCGGAAACCTTC TAG	0	3533	3548	933
848227	258	273	GAGGACTGTGCAG GAG	42	3733	3748	934
848243	481	496	AAGGCTAGCACCA GCT	23	3956	3971	935
848784	N/A	N/A	GGATATCCTGGCA GTG	0	4350	4365	936
848800	N/A	N/A	GAAAAAGCTAGTG GTC	30	4905	4920	937
848816	N/A	N/A	CTTGAAATGCCCT TTC	0	5408	5423	938
848832	N/A	N/A	TACATTCAGACG GTG	61	6279	6294	939
848848	N/A	N/A	ATTATAGCAGCCA CTA	13	6761	6776	940
848864	N/A	N/A	ATTTATTCAGCTC ATG	1	7114	7129	941

## 042765

8488 80	N/A	N/A	TGGGAAAGTCAAG AGT	44	7304	7319	942
8488 96	N/A	N/A	GCCAACTATTATT ATT	26	7655	7670	943
4668 46	669	684	GGTATCCCCGGCG GGC	45	7942	7957	944
8482 85	685	700	TGCAGGATCTTGG TGA	0	7958	7973	945
8489 12	N/A	N/A	GATAAGTGCTCAA TAC	33	8149	8164	946
8489 28	N/A	N/A	CTGGATAGCAACA GCT	71	8459	8474	947
8489 44	N/A	N/A	CGCCACAGGCCTT GGT	30	8881	8896	948
8489 60	N/A	N/A	CCAATTATTATAA CTG	21	9383	9398	949
8489 76	N/A	N/A	AGCCAGGCTGTGC CAA	0	10231	10246	950
8483 15	824	839	CTCCAGGTCCAC GGG	0	10585	10600	951
8489 92	N/A	N/A	ATTAAAGGATCTG GTC	2	11012	11027	952
8490 08	N/A	N/A	CAGACATATGCAA GGT	68	11652	11667	953
8490 24	N/A	N/A	GCCCAAGGGAGA GGAG	0	12421	12436	954
8490 40	N/A	N/A	GTTATTATTGAAT GGT	80	12909	12924	955
8490 44	N/A	N/A	GGATACACAGGCT CGC	76	13108	13123	337

## 042765

8490 56	N/A	N/A	CAGGAGGCTGCAA GCA	49	13717	1373 2	956
8490 72	N/A	N/A	CAGGAAGCAGCCC AAG	0	14175	1419 0	957
8490 88	N/A	N/A	CTCCACTGATCAG TCC	49	14582	1459 7	958
8491 04	N/A	N/A	CCAAATATGCTGC AGA	20	15185	1520 0	959
8491 20	N/A	N/A	AGAGACAGGAAG CTGC	63	15808	1582 3	960
8491 36	N/A	N/A	CACAGAAACTACA GAG	0	16199	1621 4	961
8483 30	974	989	GGGCACATTCTCG AAG	0	16366	1638 1	962
8483 60	1057	1072	CGGCCGCTGACCA CCC	0	16687	1670 2	963
4684 60	1075	1090	TTGGCCACGCCGG CAT	0	16705	1672 0	48
8483 75	1081	1096	GCACCCTTGCCA CGC	24	16711	1672 6	964
8491 52	N/A	N/A	CCAGATGGAGAGA GAC	26	16815	1683 0	965
8491 68	N/A	N/A	GGCTAGTGGGCTG CCT	0	17613	1762 8	966
8491 84	N/A	N/A	CCCTGCCCCGTGC CAG	0	17964	1797 9	967
8492 00	N/A	N/A	GCCTAACGCAGCT CTG	62	18644	1865 9	968
8492 16	N/A	N/A	GAGGAATGAGAA GGGC	61	19347	1936 2	969

## 042765

8492 32	N/A	N/A	CCGCACGGTCACA TGA	19	19592	1960 7	970
8492 48	N/A	N/A	GTGCCACAAGAAG CCC	9	20268	2028 3	971
					20286	2030 1	
8484 07	1301	1316	GAAGTTGCCGGCA GCG	24	20132	2014 7	972
8492 64	N/A	N/A	TAAATTCGGCCGC CAG	9	20958	2097 3	973
8484 23	1433	1448	AAAGAGGTCCACA CAG	0	21405	2142 0	974
8492 80	N/A	N/A	CTGTTAGCATCAC GGT	25	21542	2155 7	975
8484 39	1574	1589	GGCCAGGGTGAGC TCC	0	22067	2208 2	976
8492 96	N/A	N/A	GAGAGAGGAGGG CTTA	0	22407	2242 2	977
8484 55	1716	1731	AAAACAGCTGCCA ACC	0	22498	2251 3	978
8484 71	1774	1789	CGGGCGACGGCTG TGG	0	22556	2257 1	979
8493 12	N/A	N/A	ACACGAGCATTAA GAC	45	23172	2318 7	980
8484 85	1932	1947	GCAGGCAGCACCT GGC	7	23552	2356 7	981
8485 01	2002	2017	CAGTGGACACGGG TCC	37	23622	2363 7	982
8493 28	N/A	N/A	CTGCAAGTCAGGC TTG	20	23764	2377 9	983

## 042765

8493 44	N/A	N/A	TTTAAAGCAACGG GTG	47	24173	2418 8	984
8493 60	N/A	N/A	AGCTACACTGAGG CTC	23	24906	2492 1	985
8485 17	2177	2192	GACTTTGCATTCC AGA	41	25508	2552 3	986
8493 76	N/A	N/A	GGCAGAGGAAAAG CCAG	0	25355	2537 0	987
8493 92	N/A	N/A	TGTCACATTCCAG GGC	43	26171	2618 6	988
8494 08	N/A	N/A	AGATAGACAGATG CCT	8	27113	2712 8	989
8485 33	2402	2417	CGCCAGGTGCCGG CTC	0	27545	2756 0	990
8485 49	2550	2565	GCGGAAGCATCCC CAT	0	27693	2770 8	991
8485 65	2669	2684	CCCCACAGTGAGG GAG	20	27812	2782 7	992
8485 80	2727	2742	ACATTGGGAGCAG CTG	34	27870	2788 5	993
8485 96	2772	2787	CGGAACAAGAGCT CAA	70	27915	2793 0	994
8486 12	2832	2847	CCCTATCCATGGG AAG	39	27975	2799 0	995
8486 28	2959	2974	AGCTAAGCCTCCA TTA	15	28102	2811 7	996
8486 43	3057	3072	GCATAGAGCAGAG TAA	0	28200	2821 5	997
8486 58	3128	3143	TGCACACTGCCGA GTC	49	28271	2828 6	998
8486 74	3215	3230	CCAGGTTTCTTCCT CT	58	28358	2837 3	999
8486 89	3246	3261	TGTGAGCTTGGCA GGC	39	28389	2840 4	1000
8487 05	3268	3283	GTTTCTGGCTCAG TTC	3	28411	2842 6	1001
8487 21	3338	3353	ACCCGTAAAAATG AGG	0	28481	2849 6	1002
8487 37	3425	3440	ACGGAAAAAGTTC CAT	18	28568	2858 3	1003
8487 52	3511	3526	CTCAAGGAGGGAC AGT	33	28654	2866 9	1004
8487 68	3599	3614	AAACAGGTCTAGA AAA	17	28742	2875 7	1005

Таблица 14

Подавление mRNA PCSK9 с помощью сЕt-гэпмеров 3-10-3, нацеливающих на SEQ ID NO: 1 и 2

№ ISIS	SEQ ID: 1, стартовый сайт	SEQ ID: 1, стоп-сайт	Последовательность	% подавления	SEQ ID: 2, стартовый сайт	SEQ ID: 2, стоп-сайт	SEQ ID NO
468456	1015	1030	CACTTGCTGGCCT GTC	22	N/A	N/A	1006
848259	565	580	CTCCACGGATCCT TGG	0	N/A	N/A	1007
848301	754	769	TTCAAGGCCAGC TCCA	42	N/A	N/A	1008
848392	1159	1174	ATAAACTCCAGG CCTA	37	N/A	N/A	1009
848212	64	79	CGTCGCTGCGGA AACC	41	3539	3554	1010
848228	293	308	GTCCACGCCGGC GGCG	32	3768	3783	1011
848244	482	497	CAAGGCTAGCAC CAGC	45	3957	3972	1012
848785	N/A	N/A	GAAATCTGGGCA GGAT	39	4362	4377	1013
848801	N/A	N/A	CACCACAGCTAG TGAG	28	5003	5018	1014
848817	N/A	N/A	CACTATTTCCAGA ACA	20	5445	5460	1015
848833	N/A	N/A	AATAATCTCATGT CAG	77	6356	6371	1016
848849	N/A	N/A	CAAATTATAGCA GCCA	85	6764	6779	1017
848865	N/A	N/A	GATTTATTCAGCT CAT	65	7115	7130	1018
848881	N/A	N/A	CCACAGTACCTAT GAC	0	7330	7345	1019
848897	N/A	N/A	CAAATGCGGACC AAAA	38	7694	7709	1020
848273	670	685	AGGTATCCCCGG CGGG	26	7943	7958	1021
848286	686	701	ATGCAGGATCTT GGTG	0	7959	7974	1022
848913	N/A	N/A	CGATAAGTGCTC AATA	25	8150	8165	1023
848929	N/A	N/A	AAAGAAGGGACT TCAC	29	8476	8491	1024

## 042765

848945	N/A	N/A	ACTTAGACTACG GGTT	25	8931	8946	1025
848961	N/A	N/A	TCCTTAAATGAAT GTT	41	9399	9414	1026
848977	N/A	N/A	CTTGATCAGGCTG GGA	0	10332	1034 7	1027
848316	833	848	GGTAATCCGCTCC AGG	59	10594	1060 9	1028
848993	N/A	N/A	TCCCATTAAGG ATCT	23	11016	1103 1	1029
849009	N/A	N/A	ACACATGACCGA CCAG	0	11773	1178 8	1030
849025	N/A	N/A	CTCCAGCCAAGC CCTT	40	12570	1258 5	1031
849041	N/A	N/A	TCTGGATACTG TTG	27	13008	1302 3	1032
849044	N/A	N/A	GGATACACAGGC TCGC	85	13108	1312 3	337
849057	N/A	N/A	GGTCAGGAGGCT GCAA	61	13720	1373 5	1033
849073	N/A	N/A	TGCTCAGGAAGC AGCC	43	14179	1419 4	1034
849089	N/A	N/A	CCCTAAGGCCTCC AGT	41	14610	1462 5	1035
849105	N/A	N/A	CTGAACAGCACC TCTG	37	15220	1523 5	1036
849121	N/A	N/A	TTAGAGACAGGA AGCT	28	15810	1582 5	1037
849137	N/A	N/A	CTTATAGTTAACA CAC	0	16212	1622 7	1038

## 042765

848331	980	995	CTCCTCGGGCAC ATTC	7	16372	1638 7	1039
848361	1058	1073	CCGGCCGCTGAC CACC	30	16688	1670 3	1040
468460	1075	1090	TTGGCCACGCCG GCAT	31	16705	1672 0	48
848376	1082	1097	GGCACCCCTGGC CACG	52	16712	1672 7	1041
849153	N/A	N/A	GCCCAAGCCACC TCCC	0	16840	1685 5	1042
849169	N/A	N/A	AGGAAAGTCTCA GGGC	78	17681	1769 6	1043
849185	N/A	N/A	AGCCCCTGCCCC GTGC	18	17967	1798 2	1044
849201	N/A	N/A	GGCCTAACGCAG CTCT	34	18645	1866 0	1045
849217	N/A	N/A	AGGCACCAAGAG GATG	20	19370	1938 5	1046
849233	N/A	N/A	GCGGATTCAGA CTTG	80	19613	1962 8	1047
848408	1304	1319	CCGGAAGTTGCC GGCA	3	20135	2015 0	1048
849249	N/A	N/A	CGTGCCACAAGA AGCC	21	20269	2028 4	1049
					20287	2030 2	
849265	N/A	N/A	GCCTTTAAATTCG GCC	0	20963	2097 8	1050
848424	1435	1450	GCAAAGAGGTCC ACAC	0	21407	2142 2	1051

## 042765

849281	N/A	N/A	GGCACTGGAGGT CCCG	31	21583	2159 8	1052
848440	1582	1597	CTCAACTCGGCC AGGG	43	22075	2209 0	1053
849297	N/A	N/A	TAGGAGAGAGGA GGGC	21	22410	2242 5	1054
848456	1718	1733	GCAAAACAGCTG CCAA	24	22500	2251 5	1055
848472	1778	1793	GCAGCGGGCGAC GGCT	0	22560	2257 5	1056
849313	N/A	N/A	CTCTCACACGAG CATT	11	23177	2319 2	1057
848486	1933	1948	AGCAGGCAGCAC CTGG	35	23553	2356 8	1058
848502	2003	2018	GCAGTGGACACG GGTC	43	23623	2363 8	1059
849329	N/A	N/A	GTATGGAAGTGC AAGT	0	23772	2378 7	1060
849345	N/A	N/A	ATTTTAAAGCAA CGGG	75	24175	2419 0	1061
849361	N/A	N/A	AAACCTAAAATA GTGG	4	24928	2494 3	1062
849377	N/A	N/A	GGGCAGAGGAAA GCCA	12	25356	2537 1	1063
848518	2190	2205	TTCCATGCTCCTT GAC	11	25521	2553 6	1064
849393	N/A	N/A	ATACACTCAGGTT TCT	45	26199	2621 4	1065
849409	N/A	N/A	ACCCAGGCGGTT CTGC	10	27185	2720 0	1066

## 042765

848534	2427	2442	GTCACTGGAGCT CCTG	59	27570	2758 5	1067
848550	2554	2569	AAAGGCGGAAGC ATCC	23	27697	2771 2	1068
848566	2677	2692	GTGAAATGCCCC ACAG	34	27820	2783 5	1069
848581	2729	2744	GCACATTGGGAG CAGC	58	27872	2788 7	1070
848597	2773	2788	ACGGAACAAGAG CTCA	77	27916	2793 1	1071
848613	2869	2884	CAACGATGTTTGT CCC	67	28012	2802 7	1072
848629	2962	2977	GAAAGCTAAGCC TCCA	69	28105	2812 0	1073
848644	3059	3074	TGGCATAGAGCA GAGT	49	28202	2821 7	1074
848659	3129	3144	CTGCACACTGCC GAGT	48	28272	2828 7	1075
848675	3216	3231	TCCAGGTTTCTTC CTC	63	28359	2837 4	1076
848690	3247	3262	GTGTGAGCTTGG CAGG	78	28390	2840 5	1077
848706	3269	3284	CGTTTCTGGCTCA GTT	55	28412	2842 7	1078
848722	3342	3357	TGTTACCCGTAAA AAT	0	28485	2850 0	1079
848738	3427	3442	TAACGGAAAAAG TTCC	64	28570	2858 5	1080
848753	3513	3528	TGCTCAAGGAGG GACA	27	28656	2867 1	1081
848769	3601	3616	CAAAACAGGTCT AGAA	43	28744	2875 9	1082

Таблица 15

Подавление mRNA PCSK9 с помощью cEt-гэпмеров 3-10-3, нацеливающихся на SEQ ID NO: 1 и 2

№ ISIS	SEQ ID: 1, стартовый сайт	SEQ ID: 1, стоп-сайт	Последовательность	% подавления	SEQ ID: 2, стартовый сайт	SEQ ID: 2, стоп-сайт	SEQ ID NO
84830 2	755	770	CTTCAAGGCCA GCTCC	0	N/A	N/A	1083
84834 7	1016	1031	ACACTTGCTGG CCTGT	0	N/A	N/A	1084
84821 3	85	100	CTGCAACCATG AGCGC	4	3560	3575	1085
84822 9	309	324	CTAGAGGCCGT GCGCG	18	3784	3799	1086
84824 5	483	498	GCAAGGCTAGC ACCAG	45	3958	3973	1087
84878 6	N/A	N/A	GAAACTGGGAA ATCTG	0	4370	4385	1088
84880 2	N/A	N/A	GTCAAGCACCA CAGCT	54	5009	5024	1089
84881 8	N/A	N/A	CCTCAAGGGCT TGGTT	0	5509	5524	1090

## 042765

84883 4	N/A	N/A	AATCTATGCAG CAAAA	0	6407	6422	1091
84885 0	N/A	N/A	AACAAATTATA GCAGC	75	6766	6781	1092
84888 2	N/A	N/A	GACCACAGTAC CTATG	30	7332	7347	1093
84889 8	N/A	N/A	ACCAAATGCGG ACCAA	66	7696	7711	1094
84826 0	571	586	GGCAACCTCCA CGGAT	53	7844	7859	1095
46684 7	671	686	GAGGTATCCCC GGCGG	73	7944	7959	1096
84828 7	687	702	CATGCAGGATC TTGGT	5	7960	7975	1097
84891 4	N/A	N/A	TGCTTGGTACCC GATA	39	8161	8176	1098
84893 0	N/A	N/A	CCTAAAGAAGG GACTT	18	8479	8494	1099
84894 6	N/A	N/A	AGGCATTGACT TGTC A	46	8956	8971	1100
84896 2	N/A	N/A	TACCTAGCATCT GCTG	0	9437	9452	1101
84897 8	N/A	N/A	ACAGACTAGGA GCCTG	0	1036 1	10376	1102
84831 7	852	867	CCGCCCGGTAC CGTGG	0	1061 3	10628	1103
84899 4	N/A	N/A	AGGCATCCCAG ACAGG	52	1104 2	11057	1104
84901 0	N/A	N/A	GCACACATGAC CGACC	0	1177 5	11790	1105

## 042765

84902 6	N/A	N/A	CCCCATGCCAG CCCAA	33	1260 4	12619	1106
84904 2	N/A	N/A	ATTAATCTTCTG GATA	13	1301 6	13031	1107
84904 4	N/A	N/A	GGATACACAGG CTCGC	82	1310 8	13123	337
84905 8	N/A	N/A	GGACAGGGTCA GGAGG	22	1372 6	13741	1108
84907 4	N/A	N/A	GGATACAGGTG CTCAG	55	1418 8	14203	1109
84909 0	N/A	N/A	ACACACACTGT CTACC	38	1462 9	14644	1110
84910 6	N/A	N/A	CCTCAGGTGGA ATCAG	56	1530 6	15321	1111
84912 2	N/A	N/A	GAATAACAGTG ATGTC	17	1585 2	15867	1112
84913 8	N/A	N/A	ACCTTATAGTTA ACAC	4	1621 4	16229	1113
84833 2	982	997	TCCTCCTCGGGC ACAT	21	1637 4	16389	1114
84836 2	1059	1074	CCCGGCCGCTG ACCAC	0	1668 9	16704	1115
46846 0	1075	1090	TTGGCCACGCC GGCAT	0	1670 5	16720	48
84837 7	1083	1098	TGGCACCCCTTG GCCAC	0	1671 3	16728	1116
84915 4	N/A	N/A	GGTCAAGGCTG AACTC	27	1701 4	17029	1117
84917 0	N/A	N/A	TAGGAAAGTCT CAGGG	36	1768 2	17697	1118

## 042765

84918 6	N/A	N/A	AGGCAATAGTG ACTGT	52	1798 5	18000	1119
84920 2	N/A	N/A	CTGGAGACTGG AGGCC	0	1865 7	18672	1120
84921 8	N/A	N/A	GAAAGAGAGGC ACCAA	0	1937 7	19392	1121
84923 4	N/A	N/A	TGCGGATTTC GACTT	24	1961 4	19629	1122
84839 3	1161	1176	GAATAAACTCC AGGCC	0	1999 2	20007	1123
84840 9	1322	1337	GTAGAGGCAGG CATCG	42	2015 3	20168	1124
84925 0	N/A	N/A	CAGAAGGGTTC GGCCT	32	2031 0	20325	1125
84926 6	N/A	N/A	GGCTTTGTTTGC TTGA	68	2098 0	20995	1126
84842 5	1437	1452	GGGCAAAGAGG TCCAC	0	2140 9	21424	1127
84928 2	N/A	N/A	CATCAGGCCTA CTTCA	0	2162 4	21639	1128
84844 1	1603	1618	GAGAAGTGGAT CAGTC	0	2209 6	22111	1129
84929 8	N/A	N/A	TGCAAAAAGGG CCTGG	0	2248 2	22497	1130
84845 7	1720	1735	CTGCAAAACAG CTGCC	13	2250 2	22517	1131
84847 3	1780	1795	GCGCAGCGGGC GACGG	0	2256 2	22577	1132
84931 4	N/A	N/A	ATCCAGCCAGC TCCAC	7	2320 7	23222	1133

## 042765

84848 7	1934	1949	TAGCAGGCAGC ACCTG	0	2355 4	23569	1134
84850 3	2004	2019	GGCAGTGGACA CGGGT	26	2362 4	23639	1135
84933 0	N/A	N/A	GGCAGAACCAG AGTAT	0	2378 4	23799	1136
84934 6	N/A	N/A	CAATAGTTGCCT ATAC	0	2420 1	24216	1137
84936 2	N/A	N/A	AGACACACCCA TTGGC	8	2494 8	24963	1138
84851 9	2198	2213	GGCCGGGATTC CATGC	0	2552 9	25544	1139
84937 8	N/A	N/A	ACGCAGCACCC CACCC	0	2558 1	25596	1140
84939 4	N/A	N/A	AAGGAGAGTTA TACAC	53	2620 9	26224	1141
84941 0	N/A	N/A	GGACACAACCG TGTAT	0	2722 0	27235	1142
84853 5	2447	2462	ACCCATCCTGG GATGG	0	2759 0	27605	1143
84855 1	2556	2571	GGAAAGGCGGA AGCAT	38	2769 9	27714	1144
84856 7	2684	2699	TTGAATGGTGA AATGC	65	2782 7	27842	1145
84858 2	2731	2746	CGGCACATTGG GAGCA	33	2787 4	27889	1146
84859 8	2774	2789	CACGGAACAAG AGCTC	68	2791 7	27932	1147
84861 4	2872	2887	CCCCAACGATG TTTGT	32	2801 5	28030	1148

84863 0	2964	2979	CAGAAAGCTAA GCCTC	72	2810 7	28122	1149
46685 3	3067	3082	GCACAGCCTGG CATAG	51	2821 0	28225	1150
84866 0	3130	3145	ACTGCACACTG CCGAG	1	2827 3	28288	1151
84867 6	3218	3233	GTTCCAGGTTTC TTCC	43	2836 1	28376	1152
84869 1	3248	3263	TGTGTGAGCTTG GCAG	22	2839 1	28406	1153
84870 7	3284	3299	AGCCAGCCCAA TCTGC	0	2842 7	28442	1154
84872 3	3348	3363	CCTCACTGTTAC CCGT	36	2849 1	28506	1155
84873 9	3429	3444	GATAACGGAAA AAGTT	0	2857 2	28587	1156
84875 4	3543	3558	ATAAATGTCTG CTTGC	52	2868 6	28701	1157
84877 0	3603	3618	AGCAAAACAGG TCTAG	60	2874 6	28761	1158

Таблица 16

Подавление mRNA PCSK9 с помощью сEt-гэпмеров 3-10-3, нацеливающих на SEQ ID NO: 1 и 2

№ ISIS	SEQ ID: 1, стартов ый сайт	SEQ ID: 1, стоп- сайт	Последовательнос ть	% подавлен ия	SEQ ID: 2, стартов ый сайт	SEQ ID 2: стоп- сайт	SEQ ID NO
8483 03	756	771	ACTTCAAGGCCA GCTC	43	N/A	N/A	1159
8482 14	105	120	AACTGAACGGCG GCGC	0	3580	3595	1160
8482 30	311	326	ACCTAGAGGCCG TGCG	30	3786	3801	1161
8482 46	484	499	CGCAAGGCTAGC ACCA	45	3959	3974	1162
8487 87	N/A	N/A	GGCGAGGCAGA AACTG	29	4379	4394	1163
8488 03	N/A	N/A	TCAAGGATAAGT GACT	42	5026	5041	1164
8488 19	N/A	N/A	AGAAACATCCTC AAGG	38	5517	5532	1165
8488 35	N/A	N/A	TAATCTATGCAG CAAA	0	6408	6423	1166
8488 51	N/A	N/A	CCAAATTTCCAC ATGA	41	6797	6812	1167

## 042765

8488 67	N/A	N/A	AAGGAATACCTG AAGG	22	7153	7168	1168
8488 83	N/A	N/A	CCTCAGATACCT CTGC	17	7359	7374	1169
8488 99	N/A	N/A	GTATAGTAGATG ATAA	0	7719	7734	1170
8482 61	576	591	TGCCAGGCAACC TCCA	14	7849	7864	1171
8482 74	672	687	TGAGGTATCCCC GGCG	14	7945	7960	1172
8482 88	688	703	ACATGCAGGATC TTGG	16	7961	7976	1173
8489 15	N/A	N/A	AGCCAGTAGTTA CTGT	9	8176	8191	1174
8489 31	N/A	N/A	GAAGATGTGACA TCCA	28	8517	8532	1175
8489 47	N/A	N/A	GAGCAGACTGAT GGAA	4	8971	8986	1176
8489 63	N/A	N/A	GTGGTAACAGCC TCCT	26	9526	9541	1177
8489 79	N/A	N/A	GGACAGACTAG GAGCC	4	10363	10378	1178
8483 18	858	873	ATTCATCCGCCC GGTA	0	10619	10634	1179
8489 95	N/A	N/A	AGGTAGGCAGA GGCAT	20	11052	11067	1180
8490 11	N/A	N/A	GGCCGGGTCAGC ACAC	0	11785	11800	1181
8490 27	N/A	N/A	GGCCCATGCTTG TGGC	0	12663	12678	1182
8490 43	N/A	N/A	AGGAATGGATTA ATCT	48	13024	13039	1183
8490 44	N/A	N/A	GGATACACAGGC TCGC	81	13108	13123	337
8490 59	N/A	N/A	TCTAAGTGCAGG CGGT	23	13776	13791	1184
8490 75	N/A	N/A	CAGCAAGGTGG GCAGA	10	14274	14289	1185
8490 91	N/A	N/A	GCACAGTCCGAA CTGT	0	14660	14675	1186
8491 07	N/A	N/A	GCGGAAATGGCC TGGC	0	15353	15368	1187
8491 23	N/A	N/A	GGAGAATAACA GTGAT	62	15855	15870	1188

## 042765

8491 39	N/A	N/A	AACCTTATAGTT AACA	0	16215	1623 0	1189
8483 33	983	998	GTCCTCCTCGGG CACA	18	16375	1639 0	1190
4684 57	1017	1032	CACACTTGCTGG CCTG	0	16647	1666 2	1191
8483 63	1060	1075	TCCCGGCCGCTG ACCA	30	16690	1670 5	1192
4684 60	1075	1090	TTGGCCACGCCG GCAT	0	16705	1672 0	48
8483 78	1084	1099	CTGGCACCCCTG GCCA	0	16714	1672 9	1193
8491 55	N/A	N/A	AGACATCACCGG ATTT	42	17074	1708 9	1194
8491 71	N/A	N/A	CTGTAGGAAAGT CTCA	49	17685	1770 0	1195
8491 87	N/A	N/A	GGACACACAATC ACCT	14	18033	1804 8	1196
8492 03	N/A	N/A	CAGTAACAGTTC TAAC	0	18706	1872 1	1197
8492 19	N/A	N/A	CTTATTATCCCTT TCC	29	19395	1941 0	1198
8492 35	N/A	N/A	TCAAATTCTGCA GGAA	0	19653	1966 8	1199
8483 94	1163	1178	CCGAATAAACTC CAGG	42	19994	2000 9	1200
8484 10	1324	1339	GAGTAGAGGCA GGCAT	0	20155	2017 0	1201
8492 51	N/A	N/A	CCAAAGCCAGA AGGGT	32	20317	2033 2	1202

## 042765

8492 67	N/A	N/A	TTCTAAGTGCCA CGGG	66	21029	2104 4	1203
8484 26	1455	1470	CAATGATGTCCT CCCC	0	21427	2144 2	1204
8492 83	N/A	N/A	TCCCGATCAAAT GTCC	0	21772	2178 7	1205
8484 42	1606	1621	GCAGAGAAGTG GATCA	0	22099	2211 4	1206
8492 99	N/A	N/A	TGCCAACCTGCA AAAA	0	22490	2250 5	1207
8484 58	1728	1743	ATACAGTCCTGC AAAA	0	22510	2252 5	1208
8484 74	1803	1818	AGCTCAGCAGCT CCTC	11	22585	2260 0	1209
8493 15	N/A	N/A	ATCCAGGAGGCC AAAG	0	23228	2324 3	1210
8484 88	1937	1952	GGGTAGCAGGC AGCAC	0	23557	2357 2	1211
8485 04	2005	2020	TGGCAGTGGACA CGGG	17	23625	2364 0	1212
8493 31	N/A	N/A	GGAGAAGTAAG GTCAC	52	23827	2384 2	1213
8493 47	N/A	N/A	GTCAATAGTTGC CTAT	33	24203	2421 8	1214
8493 63	N/A	N/A	GTTCAAGGTAA GCCG	25	25011	2502 6	1215
8493 79	N/A	N/A	TGGCACAAACTG ACAC	0	25619	2563 4	1216
8493 95	N/A	N/A	TTAAGAGTGGAC TCCT	40	26260	2627 5	1217

## 042765

8494 11	N/A	N/A	CCAAAGTGCAGA CGGC	0	27260	2727 5	1218
8485 20	2222	2237	GGCCACGGTCAC CTGC	0	27365	2738 0	1219
8485 36	2455	2470	CCCCAGACACCC ATCC	26	27598	2761 3	1220
8485 52	2558	2573	CCGGAAAGGCG GAAGC	0	27701	2771 6	1221
8485 68	2700	2715	GCACAGCTCGAC CTGT	3	27843	2785 8	1222
8485 83	2737	2752	GGACATCGGCAC ATTG	68	27880	2789 5	1223
8485 99	2775	2790	GCACGGAACAA GAGCT	19	27918	2793 3	1224
8486 15	2885	2900	TTTCACACTCAC CCCC	7	28028	2804 3	1225
8486 31	2967	2982	ATCCAGAAAGCT AAGC	1	28110	2812 5	1226
8486 45	3072	3087	TGCTAGCACAGC CTGG	19	28215	2823 0	1227
8486 61	3131	3146	CACTGCACACTG CCGA	11	28274	2828 9	1228
8486 77	3219	3234	GGTTCCAGGTTT CTTC	61	28362	2837 7	1229
8486 92	3249	3264	CTGTGTGAGCTT GGCA	69	28392	2840 7	1230
8487 08	3288	3303	TCAGAGCCAGCC CAAT	8	28431	2844 6	1231
8487 24	3378	3393	GAGCTTCCTGGT CTGT	47	28521	2853 6	1232
8487 40	3431	3446	GTGATAACGGAA AAAG	65	28574	2858 9	1233
8487 55	3545	3560	AGATAAATGTCT GCTT	14	28688	2870 3	1234
8487 71	3616	3631	TTCAAGTTACAA AAGC	57	28759	2877 4	1235

Таблица 17

Подавление mRNA PCSK9 с помощью сEt-гэпмеров 3-10-3, нацеливающихся на SEQ ID NO: 1 и 2

№ ISIS	SEQ ID: 1, стартовый сайт	SEQ ID: 1, стоп-сайт	Последовательность	% подавления	SEQ ID: 2, стартовый сайт	SEQ ID 2: стоп-сайт	SEQ ID NO
848306	759	774	GCAACTTCAAGG CCAG	84	N/A	N/A	1236
848217	149	164	AGCCAGTCTCAC TGCC	30	3624	3639	1237
848233	362	377	GCTGACGGTGCC CATG	51	3837	3852	1238
848249	487	502	GAACGCAAGGCT AGCA	5	3962	3977	1239
848790	N/A	N/A	CCAAATCGGAAC CCAC	88	4478	4493	1240
848806	N/A	N/A	ACAGAACTTTC CTTC	57	5114	5129	1241
848822	N/A	N/A	TAAATTCGATTC CCAC	32	5600	5615	1242

## 042765

84883 8	N/A	N/A	AGGCAGTAATGG GCAA	92	6461	6476	1243
84885 4	N/A	N/A	TCCAACACTGAG GACC	93	6811	6826	1244
84887 0	N/A	N/A	AAAGGCAACACT TCTT	61	7222	7237	1245
84888 6	N/A	N/A	CAATATTTACTG GTTG	57	7409	7424	1246
84890 2	N/A	N/A	CTTACAAATTAC AACA	59	7751	7766	1247
84826 4	622	637	TCTGACTGCGAG AGGT	71	7895	7910	1248
46684 9	675	690	TGGTGAGGTATC CCCG	48	7948	7963	1249
46844 4	691	706	AAGACATGCAGG ATCT	30	7964	7979	1250
84891 8	N/A	N/A	GACCAATGGGTT TGAT	13	8311	8326	1251
84893 4	N/A	N/A	GAGAATACCCAG TCCC	50	8550	8565	1252
84895 0	N/A	N/A	GCTCAAGGGAAA GGCC	3	9044	9059	1253
84896 6	N/A	N/A	GGACAAGAGTGC ATCA	6	10011	10026	1254
84898 2	N/A	N/A	GGCCTTACCTGA TCAA	12	10437	10452	1255
84899 8	N/A	N/A	CTAGAACCCTTC ATTC	0	11304	11319	1256
84901 4	N/A	N/A	TCTCACCTGGTT GGAA	31	11856	11871	1257

## 042765

84903 0	N/A	N/A	GTTAAGAGTGCA GGGT	90	12708	1272 3	1258
84904 4	N/A	N/A	GGATACACAGGC TCGC	92	13108	1312 3	337
84904 6	N/A	N/A	CCGTAGGTCTTG GCTA	65	13166	1318 1	1259
84906 2	N/A	N/A	AGCTGTACCTGG GTTC	79	13888	1390 3	1260
84907 8	N/A	N/A	CCTAGAGGAACC ACTA	51	14340	1435 5	1261
84909 4	N/A	N/A	ACATGAATTTCA GGCA	73	14731	1474 6	1262
84911 0	N/A	N/A	TCTCAGCCAGGC CAAA	0	15411	1542 6	1263
84912 6	N/A	N/A	CCCTATTATAGC CTTT	67	15920	1593 5	1264
84832 1	890	905	CTCCACCAGGCT GCCT	0	16282	1629 7	1265
84833 6	986	1001	CCCGTCCTCCTC GGGC	0	16378	1639 3	1266
84914 2	N/A	N/A	CCATCAGACGGC CGTG	48	16417	1643 2	1267
84835 0	1020	1035	TGTCACACTTGC TGGC	45	16650	1666 5	1268
84836 5	1064	1079	GGCATCCCGGCC GCTG	62	16694	1670 9	1269
46846 0	1075	1090	TTGGCCACGCCG GCAT	0	16705	1672 0	48
84838 1	1098	1113	GCAGGCTGCGCA TGCT	42	16728	1674 3	1270

## 042765

84915 8	N/A	N/A	TGCAAGCAGAAG ATAG	39	17153	1716 8	1271
84917 4	N/A	N/A	CAGGAACTGACC TGAC	21	17808	1782 3	1272
84919 0	N/A	N/A	TACAGCTGCTAG TTAT	59	18086	1810 1	1273
					18399	1841 4	
84920 6	N/A	N/A	GTGCAGGCCATG GTCT	68	19054	1906 9	1274
84922 2	N/A	N/A	ATATACGAACTC AGGG	0	19426	1944 1	1275
84923 8	N/A	N/A	GGCCTTAAGAGA ACAG	46	19734	1974 9	1276
84839 7	1178	1193	GACCAGCTGGCT TTTC	2	20009	2002 4	1277
84925 4	N/A	N/A	CCCAAAGAGTAT TGGG	0	20552	2056 7	1278
84927 0	N/A	N/A	AACTATTCGGTG TATC	67	21051	2106 6	1279
84841 3	1358	1373	CCCAACTGTGAT GACC	0	21330	2134 5	1280
84842 9	1485	1500	CAAAGCAGGTGC TGCA	36	21457	2147 2	1281
84928 6	N/A	N/A	AGGTAAGACAGC CTCC	53	21856	2187 1	1282
84844 5	1619	1634	GATGACATCTTT GGCA	59	22112	2212 7	1283
84846 1	1732	1747	GACCATACAGTC CTGC	17	22514	2252 9	1284

## 042765

84847 7	1816	1831	GAGAAACTGGA GCAGC	0	22598	2261 3	1285
84930 2	N/A	N/A	TAGCAGATCGCT GACC	67	22948	2296 3	1286
84931 8	N/A	N/A	ACTCAAGCACCC TCAT	0	23394	2340 9	1287
84849 1	1985	2000	CATGCTGGCCTC AGCT	11	23605	2362 0	1288
84850 7	2008	2023	TGGTGGCAGTGG ACAC	71	23628	2364 3	1289
84933 4	N/A	N/A	AATGAGGCAGGT AATA	19	23879	2389 4	1290
84935 0	N/A	N/A	CCTCAGGGCACC ATCC	72	24293	2430 8	1291
84936 6	N/A	N/A	GGGAAAACACC ATCTT	31	25120	2513 5	1292
84938 2	N/A	N/A	AGCATCTACCTG GCAA	39	25666	2568 1	1293
84939 8	N/A	N/A	GTGTACCCAGGG CAAG	59	26373	2638 8	1294
84941 4	N/A	N/A	AAGCACATGTCT AGCG	8	27331	2734 6	1295
84852 3	2246	2261	AGTCAGGGTCCA GCCC	63	27389	2740 4	1296
84853 9	2487	2502	CATTTAAAGCT CAGC	87	27630	2764 5	1297
84855 5	2580	2595	CTCAAGGGCCAG GCCA	70	27723	2773 8	1298
84857 1	2708	2723	GCACCCGAGCAC AGCT	75	27851	2786 6	1299

## 042765

84858 6	2743	2758	GCCCACGGACAT CGGC	58	27886	2790 1	1300
84860 2	2778	2793	CTGGCACGGAAC AAGA	8	27921	2793 6	1301
84861 8	2904	2919	GATGAGGGCCAT CAGC	87	28047	2806 2	1302
84863 3	2978	2993	GGCTAGATGCCA TCCA	64	28121	2813 6	1303
84864 8	3093	3108	CCGCAGGCCACC TTTG	12	28236	2825 1	1304
84866 4	3146	3161	AGACAGTGCATG CACC	10	28289	2830 4	1305
84868 0	3222	3237	TCTGGTTCAGG TTTC	89	28365	2838 0	1306
84869 5	3255	3270	TTCCTGCTGTGT GAGC	63	28398	2841 3	1307
84871 1	3304	3319	AAGAAGAGGCTT GGCT	38	28447	2846 2	1308
84872 7	3382	3397	CACCGAGCTTCC TGGT	66	28525	2854 0	1309
84874 3	3446	3461	GTGAATCAGGCC TGGG	31	28589	2860 4	1310
84875 8	3558	3573	GGACAGACCCAA AAGA	71	28701	2871 6	1311
84877 4	3641	3656	TGCTACAAAACC CAGA	95	28784	2879 9	1312

Таблица 18

Подавление mRNA PCSK9 с помощью сЕt-гэпмеров 3-10-3, нацеливающих на SEQ ID NO: 1 и 2

№ ISIS	SEQ ID: 1, стартов ый сайт	SEQ ID: 1, стоп- сайт	Последователь ность	% подавления	SEQ ID: 2, стартов ый сайт	SEQ ID 2: стоп- сайт	SEQ ID NO
8482 18	153	168	CCCGAGCCAG TCTCAC	1	3628	3643	13 13
8482 34	368	383	CCTGGAGCTG ACGGTG	18	3843	3858	13 14
8482 50	488	503	GGAACGCAAG GCTAGC	77	3963	3978	13 15
8487 91	N/A	N/A	TTCCAAACCA AATCGG	46	4485	4500	13 16
8488 07	N/A	N/A	GGACAAAАСТ GCAAGT	42	5170	5185	13 17
8488 23	N/A	N/A	TTCTAAATTСG ATTCC	61	5603	5618	13 18
8488 39	N/A	N/A	TTAGAAAGGC AGTAAT	30	6467	6482	13 19
8488 55	N/A	N/A	CAAGGACGGC ACCAAG	37	6881	6896	13 20
8488 71	N/A	N/A	GAAGGGATGA СТАAGT	0	7242	7257	13 21
8488 87	N/A	N/A	AGGAAACCGT GGACCT	60	7437	7452	13 22
8489 03	N/A	N/A	ССТАСТTACA AATTAC	4	7755	7770	13 23
8482 65	633	648	GGGCAGTGCG CTCTGA	78	7906	7921	13 24
8482 76	676	691	TTGGTGAGGT ATCCCC	66	7949	7964	13 25

## 042765

8482 91	692	707	GAAGACATGC AGGATC	61	7965	7980	13 26
8489 19	N/A	N/A	GGCAGACCAA TGGGTT	10	8315	8330	13 27
8489 35	N/A	N/A	TAAGATTTGA AGCACT	60	8580	8595	13 28
8489 51	N/A	N/A	CTGAACTGTA AGCTCA	46	9055	9070	13 29
8489 67	N/A	N/A	GGCACTAGCA GGAGTT	62	10031	10046	13 30
8489 83	N/A	N/A	ATGGATTCAG CTCAGA	66	10680	10695	13 31
8489 99	N/A	N/A	TCCAACCTAGA ACCCTT	87	11309	11324	13 32
8490 15	N/A	N/A	CACTGAAGAG GTCTCA	17	11867	11882	13 33
8490 31	N/A	N/A	AGGAACCTGA AGATCA	72	12756	12771	13 34
8490 44	N/A	N/A	GGATACACAG GCTCGC	85	13108	13123	33 7
8490 47	N/A	N/A	TAATAATGCC CCCGTA	49	13177	13192	13 35
8490 63	N/A	N/A	AGTTAGCCCA GGTGAG	6	13951	13966	13 36
8490 79	N/A	N/A	CGCCACCCTA GAGGAA	0	14346	14361	13 37
8490 95	N/A	N/A	AGCAATTCAG TGGCTG	49	14759	14774	13 38
8491 11	N/A	N/A	CTCCAGCGCA GGTCTC	35	15433	15448	13 39

## 042765

8491 27	N/A	N/A	GTGTAAAATA AAGCCC	77	15934	15949	13 40
8483 22	900	915	GGAGATACAC CTCCAC	15	16292	16307	13 41
8483 37	987	1002	TCCCGTCCTCC TCGGG	8	16379	16394	13 42
8491 43	N/A	N/A	GGACAGTGAC AGCTGG	39	16524	16539	13 43
8483 51	1021	1036	CTGTCACACTT GCTGG	8	16651	16666	13 44
8483 66	1070	1085	CACGCCGGCA TCCCGG	3	16700	16715	13 45
4684 60	1075	1090	TTGGCCACGC CGGCAT	0	16705	16720	48
8483 82	1100	1115	GCGCAGGCTG CGCATG	0	16730	16745	13 46
8491 59	N/A	N/A	ATGCAAGTGA GTGAGT	74	17187	17202	13 47
8491 75	N/A	N/A	GGAAAGAACA GCCTCC	44	17842	17857	13 48
8491 91	N/A	N/A	GATACAGACA CCCACC	37	18250	18265	13 49
8492 07	N/A	N/A	TACCATAACT CCCCAC	37	19123	19138	13 50
8492 23	N/A	N/A	ATCAAAGTAG CCAACC	0	19482	19497	13 51
8492 39	N/A	N/A	GAAGACGGAG TAAGGC	81	19795	19810	13 52
8483 98	1183	1198	GGCTGGACCA GCTGGC	0	20014	20029	13 53

## 042765

8492 55	N/A	N/A	GGCCCAAAGA GTATTG	0	20554	20569	13 54
8492 71	N/A	N/A	GAAACTATTC GGTGTA	38	21053	21068	13 55
8484 14	1370	1385	GGCATTGGTG GCCCCA	19	21342	21357	13 56
8484 30	1492	1507	TGTGACACAA AGCAGG	84	21464	21479	13 57
8492 87	N/A	N/A	CGAAGGTAAG CCGCCT	56	21889	21904	13 58
8484 46	1626	1641	CCTCATTGATG ACATC	0	22119	22134	13 59
8484 62	1733	1748	TGACCATACA GTCCTG	19	22515	22530	13 60
8484 78	1842	1857	GCTCGCCCCG CCGCTT	35	22624	22639	13 61
8493 03	N/A	N/A	GGCTGAGTCC AGAGTA	89	22962	22977	13 62
8493 19	N/A	N/A	GAAATGGGAA TCTGCT	0	23454	23469	13 63
8484 92	1986	2001	CCATGCTGGC CTCAGC	32	23606	23621	13 64
8493 35	N/A	N/A	CAGCTATAGA GCGGCA	0	24045	24060	13 65
8493 51	N/A	N/A	GAACAGCTCA GCCTCA	0	24304	24319	13 66
8493 67	N/A	N/A	AGCCTTAGTTT CTCAG	25	25135	25150	13 67
8485 08	2047	2062	TCCCAGTGGG AGCTGC	0	25378	25393	13 68

## 042765

8493 83	N/A	N/A	CCACAGCATC TACCTG	80	25670	25685	13 69
8493 99	N/A	N/A	CCAGGAAGAG CACCTG	17	26406	26421	13 70
8494 15	N/A	N/A	AGAAAGCACA TGTCTA	0	27334	27349	13 71
8485 24	2250	2265	AGCCAGTCAG GGTCCA	55	27393	27408	13 72
8485 40	2490	2505	AACCATTTTA AAGCTC	45	27633	27648	13 73
8485 56	2582	2597	CACTCAAGGG CCAGGC	37	27725	27740	13 74
8485 72	2709	2724	AGCACCCGAG CACAGC	89	27852	27867	13 75
8485 87	2752	2767	AGTCATTCTGC CCACG	78	27895	27910	13 76
8486 03	2779	2794	CCTGGCACGG AACAAG	51	27922	27937	13 77
8486 19	2906	2921	GAGATGAGGG CCATCA	80	28049	28064	13 78
8486 34	2999	3014	GCGCACCTGT CTCCAG	0	28142	28157	13 79
8486 49	3110	3125	TCCTAGGTGA TGGCTC	80	28253	28268	13 80
8486 65	3148	3163	TGAGACAGTG CATGCA	37	28291	28306	13 81
8486 81	3223	3238	CTCTGGTTCCA GGTTT	43	28366	28381	13 82
8486 96	3256	3271	GTTCTGCTGT GTGAG	78	28399	28414	13 83
8487 12	3306	3321	GTAAGAAGAG GCTTGG	75	28449	28464	13 84
8487 28	3383	3398	TCACCGAGCT TCCTGG	50	28526	28541	13 85
8487 44	3451	3466	GGCCAGTGAA TCAGGC	17	28594	28609	13 86
8487 59	3563	3578	AGAGAGGACA GACCCA	83	28706	28721	13 87
8487 75	3644	3659	AAATGCTACA AAACCC	67	28787	28802	13 88
8483 07	760	775	GGCAACTTCA AGGCCA	0	N/A	N/A	13 89

Таблица 19

Подавление mRNA PCSK9 с помощью сЕт-гэпмеров 3-10-3, нацеливающихся на SEQ ID NO: 1 и 2

№ ISIS	SEQ ID: 1, стартовый сайт	SEQ ID: 1, стоп-сайт	Последовательность	% подавления	SEQ ID: 2, стартовый сайт	SEQ ID: 2, стоп-сайт	SEQ ID NO
848219	181	196	CGCTGCTGCAA CGACG	66	3656	3671	1390
848235	378	393	ACCAGGACCGC CTGGA	0	3853	3868	1391
848251	489	504	CGGAACGCAAG GCTAG	62	3964	3979	1392
848792	N/A	N/A	GTCATAAAGAA ATTGC	47	4593	4608	1393
848808	N/A	N/A	TGGCAGAATTTT CCCC	17	5249	5264	1394
848824	N/A	N/A	TTTCATTCTAAA TTCG	58	5608	5623	1395
848840	N/A	N/A	CTTTACCCAAA GCCTT	0	6523	6538	1396
848856	N/A	N/A	CATAGCGGGAG AACTT	51	6908	6923	1397
848872	N/A	N/A	GCAGAAGGGAT GACTA	53	7245	7260	1398
848888	N/A	N/A	AGCCAGGAAAC CGTGG	63	7441	7456	1399
848904	N/A	N/A	CCCTACTTACAA ATTA	40	7756	7771	1400
848266	640	655	AGGCGGCGGGC AGTGC	31	7913	7928	1401
848277	677	692	CTTGGTGAGGT ATCCC	65	7950	7965	1402
848292	693	708	GGAAGACATGC AGGAT	64	7966	7981	1403
848920	N/A	N/A	AGGCAGACCAA TGGGT	63	8316	8331	1404
848936	N/A	N/A	CTAGAAGGTGG TGCAG	0	8619	8634	1405
848952	N/A	N/A	CCATAGTCAAC TGTAC	7	9097	9112	1406
848968	N/A	N/A	AGCCAATGGGA GGCAC	15	10042	10057	1407
848308	761	776	GGGCAACTTCA AGGCC	7	10522	10537	1408

## 042765

8489 84	N/A	N/A	GGGCAGAGCAA ATGGA	0	10691	1070 6	1409
8490 00	N/A	N/A	G TTCACCCCAA GCTCT	29	11420	1143 5	1410
8490 16	N/A	N/A	CTCCACTGAAG AGGTC	66	11870	1188 5	1411
8490 32	N/A	N/A	GATTTAACCCCTC CAAA	0	12814	1282 9	1412
8490 44	N/A	N/A	GGATACACAGG CTCGC	86	13108	1312 3	337
8490 48	N/A	N/A	GTTAATAATGC CCCCG	80	13179	1319 4	1413
8490 64	N/A	N/A	GCTGAGTTAGC CCAGG	51	13955	1397 0	1414
8490 80	N/A	N/A	AAACAGTGCTC GCCAC	29	14356	1437 1	1415
8490 96	N/A	N/A	TACAGAGCAAT TCAGT	33	14764	1477 9	1416
8491 12	N/A	N/A	TGCCAGGCAGG TCCAG	0	15506	1552 1	1417
8491 28	N/A	N/A	CAATATCTAAC AATAA	0	15977	1599 2	1418
8483 23	905	920	GTCTAGGAGAT ACACC	72	16297	1631 2	1419
8483 38	988	1003	GTCCCGTCCTCC TCGG	33	16380	1639 5	1420
8491 44	N/A	N/A	AATCAGCAGGT GGCTG	0	16579	1659 4	1421
8483 52	1022	1037	ACTGTCACACTT GCTG	45	16652	1666 7	1422

## 042765

8483 67	1072	1087	GCCACGCCGGC ATCCC	27	16702	1671 7	1423
4684 60	1075	1090	TTGGCCACGCC GGCAT	2	16705	1672 0	48
8483 83	1105	1120	AGCACGCGCAG GCTGC	0	16735	1675 0	1424
8491 60	N/A	N/A	CCACATCTGCCT GGCC	0	17226	1724 1	1425
8491 76	N/A	N/A	TGCCAGGTCAT GCAAT	0	17954	1796 9	1426
8491 92	N/A	N/A	GGGATACAGAC ACCCA	48	18252	1826 7	1427
8492 08	N/A	N/A	CCATACCATAA CTCCC	36	19126	1914 1	1428
8492 24	N/A	N/A	CAATTACACCA GCAAT	64	19496	1951 1	1429
8492 40	N/A	N/A	CTGCGAAAATA TTTTT	32	19835	1985 0	1430
8483 99	1188	1203	CCACAGGCTGG ACCAG	8	20019	2003 4	1431
8492 56	N/A	N/A	CCTCAACCGCTC CCAT	15	20631	2064 6	1432
8492 72	N/A	N/A	GAGATAGGAAA CTATT	19	21060	2107 5	1433
8484 15	1388	1403	GGTCACCGGCT GGTCT	0	21360	2137 5	1434
8484 31	1500	1515	TCCCACTCTGTG ACAC	93	21472	2148 7	1435
8492 88	N/A	N/A	ACAGACACTAA GCTCT	76	21910	2192 5	1436

## 042765

8484 47	1628	1643	GGCCTCATTGAT GACA	0	22121	2213 6	1437
8484 63	1734	1749	CTGACCATACA GTCCT	15	22516	2253 1	1438
8484 79	1850	1865	CTCCATGCGCTC GCCC	39	22632	2264 7	1439
8493 04	N/A	N/A	CTAGAGATGGC TGAGT	56	22970	2298 5	1440
8493 20	N/A	N/A	ACGGAAATGGG AATCT	0	23457	2347 2	1441
8484 93	1990	2005	GTCCCCATGCTG GCCT	33	23610	2362 5	1442
8493 36	N/A	N/A	ATACAGAGATG TTAAG	30	24079	2409 4	1443
8493 52	N/A	N/A	TCTTATTCCAGG CTGG	23	24362	2437 7	1444
8493 68	N/A	N/A	AGCTGACCAGC TGTGT	0	25180	2519 5	1445
8485 09	2064	2079	TGCCAAGGTCC TCCAC	18	25395	2541 0	1446
8493 84	N/A	N/A	CAAAAACAGAC CCAGC	11	25733	2574 8	1447
8494 00	N/A	N/A	AAATAGATGCT CCAGG	35	26465	2648 0	1448
8494 16	N/A	N/A	CGAGGAAAAGA AAGCA	20	27342	2735 7	1449
8485 25	2254	2269	CTGCAGCCAGT CAGGG	1	27397	2741 2	1450
8485 41	2494	2509	TCGGAACCATT TAAA	0	27637	2765 2	1451

## 042765

8485 57	2585	2600	CCCCACTCAAG GGCCA	0	27728	2774 3	1452
8485 73	2710	2725	CAGCACCCGAG CACAG	23	27853	2786 8	1453
8485 88	2755	2770	AAAAGTCATTC TGCCC	62	27898	2791 3	1454
8486 04	2780	2795	GCCTGGCACGG AACAA	55	27923	2793 8	1455
8486 20	2909	2924	CTGGAGATGAG GGCCA	24	28052	2806 7	1456
8486 35	3021	3036	GCACAGCCTGT GACCA	71	28164	2817 9	1457
8486 50	3120	3135	GCCGAGTCAGT CCTAG	23	28263	2827 8	1458
8486 66	3150	3165	GCTGAGACAGT GCATG	47	28293	2830 8	1459
4684 97	3224	3239	CCTCTGGTTCCA GGTT	77	28367	2838 2	1460
8486 97	3257	3272	AGTTCCTGCTGT GTGA	44	28400	2841 5	1461
8487 13	3308	3323	AAGTAAGAAGA GGCTT	0	28451	2846 6	1462
8487 29	3384	3399	CTCACCGAGCTT CCTG	76	28527	2854 2	1463
8487 45	3456	3471	CGCCAGGCCAG TGAAT	44	28599	2861 4	1464
8487 60	3565	3580	ACAGAGAGGAC AGACC	45	28708	2872 3	1465
8487 76	3661	3676	AGTCACCATATT AATA	63	28804	2881 9	1466

Таблица 20

Подавление mRNA PCSK9 с помощью cEt-гэпмеров 3-10-3, нацеливающих на SEQ ID NO: 1 и 2

№ ISIS	SEQ ID: 1, стартовый сайт	SEQ ID: 1, стоп-сайт	Последовательность	% подавления	SEQ ID: 2, стартовый сайт	SEQ ID: 2: стоп-сайт	SEQ ID NO
848432	1535	1550	TGCAATGCCAGCC ACG	0	N/A	N/A	1467
848220	184	199	AGCCGCTGCTGCA ACG	57	3659	3674	1468
848236	381	396	GCCACCAGGACCG CCT	28	3856	3871	1469
848252	492	507	CCTCGGAACGCAA GGC	38	3967	3982	1470
848793	N/A	N/A	AGCATGAGTTCTGT GT	43	4607	4622	1471
848809	N/A	N/A	CAGCACACTCAGA CAG	47	5288	5303	1472
848825	N/A	N/A	AAAAGGATTGGTC TAA	0	5652	5667	1473
848841	N/A	N/A	CCCTTTACCCAAAG CC	71	6525	6540	1474
848857	N/A	N/A	AATCAGCCTTCAAG GG	39	6928	6943	1475

## 042765

84887 3	N/A	N/A	GGCAGAAGGGATG ACT	35	7246	7261	147 6
84888 9	N/A	N/A	TCGACAACAGGTTT TC	58	7576	7591	147 7
84890 5	N/A	N/A	TGACATGGAAGAA ACC	34	7801	7816	147 8
84826 7	642	657	GCAGGCGGCGGGC AGT	0	7915	7930	147 9
84827 8	678	693	TCTTGGTGAGGTAT CC	52	7951	7966	148 0
84829 3	694	709	TGGAAGACATGCA GGA	26	7967	7982	148 1
84892 1	N/A	N/A	TGCATTGGCACAA GAA	44	8340	8355	148 2
84893 7	N/A	N/A	AGTTAGAGGCCAG GAA	25	8645	8660	148 3
84895 3	N/A	N/A	TCCCATAGTCAACT GT	11	9099	9114	148 4
84896 9	N/A	N/A	TTGCAAAGCTTCCA GT	7	10065	10080	148 5
46844 6	775	790	ATGTAGTCGACATG GG	38	10536	10551	148 6
84898 5	N/A	N/A	CGAGAAGTGGAAA CCA	0	10727	10742	148 7
84900 1	N/A	N/A	GTGAAAGCTGAGT TCA	6	11431	11446	148 8
84901 7	N/A	N/A	GGGTGGTAATTTGT CA	15	12045	12060	148 9
84903 3	N/A	N/A	AATAACTGATTTAA CC	12	12821	12836	149 0

## 042765

84904 4	N/A	N/A	GGATACACAGGCT CGC	82	13108	1312 3	337
84904 9	N/A	N/A	G TTCATTCCACTGC TT	30	13216	1323 1	149 1
84906 5	N/A	N/A	CAACGCACATCGA GCA	39	14038	1405 3	149 2
84908 1	N/A	N/A	ACCAAACAGTGCT CGC	48	14359	1437 4	149 3
84909 7	N/A	N/A	AATAAGGTCTGGCT CA	43	14829	1484 4	149 4
84911 3	N/A	N/A	ACAGATGCCAGGC AGG	10	15511	1552 6	149 5
84912 9	N/A	N/A	TCAATATCTAACAA TA	0	15978	1599 3	149 6
84832 4	917	932	CTGTATGCTGGTGT CT	0	16309	1632 4	149 7
84833 9	989	100 4	GGTCCCGTCCTCCT CG	0	16381	1639 6	149 8
84914 5	N/A	N/A	CATGAGAAAGACC CCC	0	16611	1662 6	149 9
84835 3	1024	103 9	TGACTGTCACACTT GC	56	16654	1666 9	150 0
84836 8	1073	108 8	GGCCACGCCGGCA TCC	0	16703	1671 8	150 1
46846 0	1075	109 0	TTGGCCACGCCGGC AT	0	16705	1672 0	48
84838 4	1109	112 4	GTTGAGCACGCGC AGG	58	16739	1675 4	150 2
84916 1	N/A	N/A	CTCCACCACATCTG CC	30	17231	1724 6	150 3

## 042765

84917 7	N/A	N/A	CGTGCCAGGTCATG CA	74	17956	1797 1	150 4
84919 3	N/A	N/A	TGGGATACAGACA CCC	5	18253	1826 8	150 5
84920 9	N/A	N/A	TAAAAGACTCCAT GCC	0	19151	1916 6	150 6
84922 5	N/A	N/A	GCAATTACACCAG CAA	84	19497	1951 2	150 7
84924 1	N/A	N/A	GCACAGAGTGATG GTT	66	19908	1992 3	150 8
84840 0	1190	120 5	CCCCACAGGCTGG ACC	34	20021	2003 6	150 9
84925 7	N/A	N/A	CTGCACCGGGCAT GCG	0	20686	2070 1	151 0
84927 3	N/A	N/A	CCCTACCATAGCCA GG	36	21118	2113 3	151 1
84841 6	1394	140 9	CCCCAGGGTCACC GGC	38	21366	2138 1	151 2
84928 9	N/A	N/A	GCACACAGACACT AAG	0	21914	2192 9	151 3
84844 8	1633	164 8	AACCAGGCCTCATT GA	0	22126	2214 1	151 4
84846 4	1735	175 0	GCTGACCATACAGT CC	9	22517	2253 2	151 5
84930 5	N/A	N/A	CTATCCTGTAGCAT CA	73	23060	2307 5	151 6
84932 1	N/A	N/A	GACGGAAATGGGA ATC	0	23458	2347 3	151 7
84848 0	1875	189 0	GGCAGACCAGCTT GCC	0	23495	2351 0	151 8

## 042765

84849 4	1991	200 6	GGTCCCCATGCTGG CC	0	23611	2362 6	151 9
84933 7	N/A	N/A	TAGCACTCATCATT TC	33	24098	2411 3	152 0
84935 3	N/A	N/A	GACGAGAATCAAC TCT	6	24383	2439 8	152 1
84936 9	N/A	N/A	CACCAGGACTCCTG TG	4	25209	2522 4	152 2
84851 0	2074	208 9	GGCTTGTGGGTGCC AA	15	25405	2542 0	152 3
84938 5	N/A	N/A	CTCCAAGTGGAGT GGG	0	25786	2580 1	152 4
84940 1	N/A	N/A	ACTAAAATAGATG CTC	34	26469	2648 4	152 5
84941 7	N/A	N/A	TGCCAGAGCCCGA GGA	0	27352	2736 7	152 6
84852 6	2259	227 4	GGGCACTGCAGCC AGT	0	27402	2741 7	152 7
84854 2	2500	251 5	GACAAGTCGGAAC CAT	77	27643	2765 8	152 8
84855 8	2598	261 3	GGCAAGGAGGCTG CCC	0	27741	2775 6	152 9
84857 4	2711	272 6	GCAGCACCCGAGC ACA	70	27854	2786 9	153 0
84858 9	2756	277 1	TAAAAGTCATTCTG CC	56	27899	2791 4	153 1
84860 5	2781	279 6	TGCCTGGCACGGA ACA	44	27924	2793 9	153 2
84862 1	2915	293 0	AGTTAGCTGGAGA TGA	0	28058	2807 3	153 3

84863 6	3027	304 2	ACCAAGGCACAGC CTG	70	28170	2818 5	153 4
84865 1	3121	313 6	TGCCGAGTCAGTCC TA	69	28264	2827 9	153 5
84866 7	3163	317 8	GTGGAGCGGGTTG GCT	26	28306	2832 1	153 6
84868 2	3225	324 0	CCCTCTGGTTCCAG GT	23	28368	2838 3	153 7
84869 8	3259	327 4	TCAGTTCCTGCTGT GT	30	28402	2841 7	153 8
84871 4	3311	332 6	GTGAAGTAAGAAG AGG	47	28454	2846 9	153 9
84873 0	3385	340 0	ACTCACCGAGCTTC CT	63	28528	2854 3	154 0
84874 6	3469	348 4	TTAGAAGCATCTCC GC	44	28612	2862 7	154 1
84876 1	3569	358 4	GGCAACAGAGAGG ACA	79	28712	2872 7	154 2
84877 7	3666	368 1	TAAAAAGTCACCA TAT	9	28809	2882 4	154 3

Пример 2. Дозозависимое антисмысловое подавление PCSK9 человека в клетках HepG2 с помощью cEt-гэпмеров 3-10-3.

Отобранные гэпмеры из примера 1, демонстрирующие подавление mRNA PCSK9 *in vitro*, тестировали в различных дозах в клетках HepG2. Антисмысловые олигонуклеотиды тестировали в серии экспериментов, в которых были сходные условия культивирования. Результаты каждого эксперимента представлены в показанных ниже отдельных таблицах.

#### Исследование 1.

Клетки высевали при плотности 20000 клеток на лунку и трансфицировали путем электропорации антисмысловым олигонуклеотидом в концентрациях 46,88 нМ, 187,5 нМ, 750 нМ и 3000 нМ, как указано в приведенных ниже таблицах. ISIS 405879, ранее раскрытый в WO2008066776, также был включен в исследование в качестве олигонуклеотида для сопоставления. После периода обработки, составлявшего примерно 16 часа, РНК выделяли из клеток и измеряли уровни mRNA PCSK9 с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Для измерения уровней mRNA использовали набор праймеров и зондов для PCSK9 человека от ABI (ID № Hs03037355\_m1). Уровни mRNA PCSK9 корректировали в соответствии с общим содержанием РНК, измеренным с помощью RIBOGREEN®. Результаты представлены в виде процента подавления PCSK9 по сравнению с необработанными контрольными клетками.

Также представлена концентрация полумаксимального подавления ( $IC_{50}$ ) для каждого олигонуклеотида. Уровни mRNA PCSK9 снижались дозозависимым образом в клетках, обработанных антисмысловым олигонуклеотидом. Некоторые из новых сконструированных антисмысловых олигонуклеотидов демонстрировали лучшую эффективность по сравнению с ранее раскрытым олигонуклеотидом ISIS 405879. В частности, ISIS 848542, ISIS 848593, ISIS 848597, ISIS 848598, ISIS 848630, ISIS 848833, ISIS 849040, ISIS 849171 и ISIS 849236 демонстрировали лучшую эффективность по сравнению с ранее раскрытым олигонуклеотидом ISIS 405879.

Таблица 21

№ ISIS	46,875 нМ	187,5 нМ	750 нМ	3000 нМ	IC <sub>50</sub> (мкМ)
405879	13	6	3	29	>3,00
466847	1	19	65	94	0,47
468497	12	27	60	83	0,48
848219	0	0	54	88	0,91
848241	0	5	31	63	1,78
848283	18	27	54	85	0,48
848306	0	19	53	91	0,62
848323	0	0	0	50	>3,00
848376	0	3	12	43	>3,00
848430	0	30	52	81	0,62
848431	67	79	92	96	<0,05
848500	6	30	55	82	0,54
848539	0	0	0	55	>3,00
848542	10	30	66	86	0,41
848560	12	32	76	91	0,33
848567	0	1	42	89	0,85
848570	23	27	67	87	0,35
848572	18	44	71	81	0,30
848574	0	5	68	95	0,55
848575	0	17	51	80	0,75
848576	11	18	45	74	0,86
848583	3	18	62	88	0,52
848584	0	22	54	89	0,57
848585	1	22	67	92	0,45
848593	0	25	53	83	0,63
848596	18	40	76	93	0,26
848597	22	42	78	87	0,24
848598	0	18	62	95	0,53
848616	0	14	55	88	0,66
848618	0	0	56	77	0,96
848619	3	7	41	74	1,07
848629	21	34	78	78	0,31
848630	7	22	65	83	0,50
848632	25	34	68	89	0,29
848635	0	0	49	83	0,92
848636	5	34	77	76	0,42
848649	5	10	43	78	0,89

## 042765

848651	4	0	48	88	0,88
848652	0	6	28	80	1,16
848656	1	13	52	80	0,73
848670	0	38	84	85	0,39
848671	26	28	70	81	0,34
848672	0	11	27	73	1,37
848674	36	31	69	89	0,24
848677	2	32	69	90	0,41
848679	0	11	55	81	0,73
848680	11	20	64	81	0,52
848685	0	14	33	62	1,63
848687	0	25	63	90	0,51
848688	0	23	61	89	0,55
848690	15	21	78	84	0,39
848692	31	45	80	97	0,17
848693	8	23	69	88	0,44
848694	27	43	75	93	0,21
848701	0	10	39	77	1,02
848704	11	5	43	78	0,94
848725	0	9	51	81	0,79
848729	26	33	63	92	0,30
848731	0	15	60	89	0,55
848732	12	71	67	90	0,21
848736	6	18	40	73	1,00
848740	2	18	59	86	0,57
848748	9	42	60	85	0,39
848756	3	1	55	85	0,72
848759	18	37	75	94	0,28
848761	20	35	68	81	0,35

**042765**

848764	0	8	37	64	1,52
848770	0	4	63	90	0,63
848771	3	23	57	93	0,50
848772	15	32	66	82	0,40
848774	0	8	64	90	0,61
848790	0	0	33	73	1,49
848795	9	42	62	91	0,35
848811	7	5	46	86	0,75
848814	17	20	64	89	0,43
848826	7	57	77	93	0,24
848830	0	35	45	86	0,62
848832	0	40	71	78	0,52
848833	19	43	68	81	0,32
848838	0	36	72	89	0,39
848841	5	24	62	86	0,50
848844	0	22	61	89	0,53
848849	9	48	79	92	0,26
848850	0	38	68	97	0,43
848854	2	7	58	84	0,66
848875	3	17	58	79	0,65
848890	0	6	27	65	1,74
848898	7	14	79	87	0,43
848927	12	25	75	95	0,35
848928	0	0	45	78	1,01
848971	0	21	54	82	0,65
848999	6	29	34	64	1,38
849007	0	4	41	78	1,02
849008	0	39	74	90	0,42
849013	4	17	47	86	0,67

042765

849016	0	23	56	79	0,65
849020	0	13	40	67	1,28
849021	10	34	65	80	0,44
849030	2	28	58	86	0,52
849036	2	1	37	76	1,16
849040	28	55	79	96	0,15
849044	26	39	72	91	0,28
849048	0	30	60	79	0,61
849069	12	12	40	74	1,02
849071	2	31	65	92	0,42
849084	0	0	0	43	>3,00
849085	20	39	64	89	0,31
849086	13	40	69	81	0,36
849106	20	24	55	80	0,53
849120	0	15	61	80	0,64
849123	9	48	82	84	0,27
849133	0	0	29	70	1,62
849135	25	54	79	95	0,17
849162	0	4	35	75	1,19
849169	34	63	72	83	0,12
849171	9	60	63	83	0,30
849177	0	16	69	75	0,68
849178	0	22	53	83	0,65
849181	6	8	39	84	0,86
849189	24	44	81	90	0,21
849200	0	0	34	70	1,48
849205	7	29	51	88	0,52
849216	0	15	28	66	1,66
849225	23	47	78	94	0,21

849227	7	35	74	94	0,34
849233	9	42	68	93	0,32
849236	0	1	57	88	0,73
849239	18	38	74	86	0,30
849266	0	22	66	86	0,51
849267	18	69	72	94	0,17
849285	3	18	45	84	0,71
849288	0	0	0	52	>3,00
849303	18	33	57	72	0,54
849305	25	28	62	82	0,40
849309	10	18	59	82	0,57
849331	0	10	65	93	0,57
849332	0	0	48	76	1,09
849345	0	0	62	80	0,78
849354	0	0	43	64	1,49
849357	5	21	45	75	0,84
849358	0	10	45	79	0,88
849359	3	22	46	88	0,62
849372	0	15	29	82	1,04
849383	2	0	33	71	1,43
849386	11	18	51	84	0,60

#### Исследование 2.

Клетки высевали при плотности 20000 клеток на лунку и трансфицировали путем электропорации антисмысловым олигонуклеотидом в концентрациях 78,13, 312,5, 1250 и 5000 нМ, как указано в приведенных ниже таблицах. ISIS 431131, ранее раскрытый в WO2014179620, также был включен в исследование в качестве олигонуклеотида для сопоставления. После периода обработки, составлявшего примерно 16 ч, РНК выделяли из клеток и измеряли уровни mRNA PCSK9 с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Для измерения уровней mRNA использовали набор праймеров и зондов для PCSK9 человека от ABI (ID № Hs03037355\_m1). Уровни mRNA PCSK9 корректировали в соответствии с общим содержанием РНК, измеренным с помощью RIBOGREEN®. Результаты представлены в виде процента подавления PCSK9 по сравнению с необработанными контрольными клетками.

Также представлена концентрация полумаксимального подавления ( $IC_{50}$ ) для каждого олигонуклеотида. Уровни mRNA PCSK9 снижались дозозависимым образом в клетках, обработанных антисмысловым олигонуклеотидом. Некоторые из новых сконструированных антисмысловых олигонуклеотидов демонстрировали лучшую эффективность по сравнению с ранее раскрытым олигонуклеотидом ISIS 431131.

Таблица 22

№ ISIS	78,125 нМ	312,5 нМ	1250 нМ	5000 нМ	IC <sub>50</sub> (мкМ)
431131	18	16	30	55	>5
849169	23	57	86	92	0,28
859341	24	48	69	85	1,54
859346	27	54	80	94	0,27
859358	0	30	69	89	0,76
859361	28	53	73	94	0,30
859363	38	50	79	82	0,20
859384	19	59	76	94	0,30
859387	36	66	79	96	0,16
859392	14	33	63	81	0,96
859393	20	59	90	96	0,27
859394	43	65	80	96	0,12
859395	37	51	82	91	0,21
859401	27	64	88	94	0,20
859408	0	59	61	92	0,55
859419	22	58	77	84	0,31
859459	33	55	91	93	0,19
859462	31	56	78	96	0,24
859469	26	48	76	83	0,36
859472	19	35	67	87	0,56
859504	19	47	59	80	0,57
859529	19	50	88	94	0,32
859531	33	52	76	69	0,29
859532	24	55	79	90	0,30
859533	9	40	77	91	0,51
859534	25	49	85	85	0,70
859551	25	41	51	78	0,69
859552	0	17	53	78	1,36
859553	24	45	79	94	0,35
859561	28	54	71	92	0,30
859571	35	34	76	73	0,43
859584	19	51	85	95	0,32
859598	33	55	73	83	0,25
859601	23	39	63	90	0,50
859603	0	6	70	71	1,25
859605	9	42	67	83	0,62
859611	21	22	47	76	1,16

Пример 3. Переносимость конъюгированных на 3'-конце сEt-гэпмеров 3-10-3, нацеливающих на PCSK9 человека, у мышей BALB/c.

Олигонуклеотиды ISIS, отобранные после вышеприведенных исследований, конъюгировали с концевой кэп-структурой 3'-ТНА-С6-GalNAc3-(3R,5S)-5-(гидроксиметил)пирролидин-3-олфосфатом (в дальнейшем называемой 3'-ТНА). Сто шестьдесят два антисмысловых олигонуклеотида ISIS, конъюгированных с 3'-ТНА, которые оценивали в отношении изменений уровней биохимических маркеров плазмы крови, представлены в приведенной ниже таблице. "Исходный олигонуклеотид" указывает на олиго-

нуклеотид ISIS, который был описан в вышеприведенных исследованиях и который конъюгировали с 3'-ТНА и тестировали в данном исследовании.

Таблица 23  
Конъюгированные на 3'-конце сEt-гэпмеры 3-10-3, выбранные  
для оценки переносимости у мышей BALB/c

<b>№ ISIS</b>	<b>Исходный олигонуклеотид</b>	<b>SEQ ID NO</b>
863413	466847	1096
863415	848219	1390
863416	848241	777
863418	848306	1236
863419	848323	1419
863421	848430	1357
863422	848431	1435
863423	848500	905
863424	848539	1297
863425	848542	1528
863426	848560	607
863427	848567	1145
863428	848570	451
863429	848572	1375
863433	848583	1223
863434	848584	377
863435	848585	452
863436	848593	763
863437	848596	994
863438	848597	1071
863439	848598	1147
863440	848616	379
863441	848618	1302
863442	848619	1378

042765

863443	848629	1073
863444	848630	1149
863445	848632	455
863446	848635	1457
863447	848636	1534
863448	848649	1380
863449	848651	1535
863451	848656	844
863452	848670	691
863453	848671	768
863457	848679	458
863458	848680	1306
863464	848693	384
863465	848694	459
863468	848725	386
863472	848736	926
863473	848740	1233
863474	848748	619
863475	848756	388
863476	848759	1387
863477	848761	1542
863478	848764	697
863479	848770	1158
863480	848771	1235
863481	848772	389
863482	848774	1312
863483	848790	1240
863484	848795	549
863485	848811	550

042765

863486	848814	781
863487	848826	474
863488	848830	782
863489	848832	939
863490	848833	1016
863491	848838	1243
863492	848841	1474
863493	848844	629
863494	848849	1017
863495	848850	1092
863496	848854	1244
863497	848875	554
863498	848890	478
863499	848898	1094
863500	848927	871
863501	848928	947
863502	848971	563
863503	848999	1332
863504	849007	877
863505	849008	953
863506	849013	410
863507	849016	1411
863508	849020	644
863509	849021	721
863510	849030	1258
863511	849036	645
863512	849040	955
863513	849044	337
863514	849048	1413

**042765**

863515	849069	724
863516	849071	881
863517	849084	648
863518	849085	725
863519	849086	802
863520	849106	1111
863521	849120	960
863522	849123	1188
863523	849133	728
863524	849135	885
863525	849162	504
863526	849169	1043
863527	849171	1195
863531	849189	426
863532	849200	968
863533	849205	427
863535	849225	1507
863536	849227	585
863537	849233	1047
863538	849236	353
863539	849239	1352
863540	849266	1126
863541	849267	1203
863542	849285	434
863543	849288	1436
863544	849303	1362
863545	849305	1516
863546	849309	749
863547	849331	1213

863548	849332	367
863549	849345	1061
863550	849354	523
863551	849357	754
863552	849358	831
863553	849359	908
863554	849372	678
863555	849383	1369
863556	849386	526
884269	859561	55
884270	859459	180
884271	859395	164
884272	859603	218
884273	859504	284
884274	859394	87
884275	859598	141
884276	859531	198
884277	859469	28
884278	859346	152
884279	859361	79
884280	859472	276

Мыши BALB/c представляют собой многоцелевую мышиную модель, часто применяемую для тестирования безопасности и эффективности. Мышам вводили однократную дозу олигонуклеотида. Уровни трансаминаз в плазме крови измеряли с помощью автоматического клинико-биохимического анализатора (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, Нью-Йорк). Из дальнейших исследований исключали олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения уровней ALT и/или AST, выходящие за пределы ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов. ISIS 863413, ISIS 863419, ISIS 863424, ISIS 863425, ISIS 863427, ISIS 863433, ISIS 863434, ISIS 863436, ISIS 863437, ISIS 863438, ISIS 863439, ISIS 863441, ISIS 863444, ISIS 863445, ISIS 863448, ISIS 863452, ISIS 863472, ISIS 863473, ISIS 863474, ISIS 863475, ISIS 863477, ISIS 863479, ISIS 863480, ISIS 863481, ISIS 863482, ISIS 863483, ISIS 863484, ISIS 863485, ISIS 863486, ISIS 863489, ISIS 863490, ISIS 863491, ISIS 863493, ISIS 863494, ISIS 863495, ISIS 863496, ISIS 863497, ISIS 863498, ISIS 863499, ISIS 863502, ISIS 863506, ISIS 863507, ISIS 863509, ISIS 863510, ISIS 863511, ISIS 863512, ISIS 863514, ISIS 863516, ISIS 863517, ISIS 863518, ISIS 863520, ISIS 863522, ISIS 863524, ISIS 863525, ISIS 863526, ISIS 863527, ISIS 863531, ISIS 863533, ISIS 863536, ISIS 863537, ISIS 863538, ISIS 863539, ISIS 863541, ISIS 863545, ISIS 863547, ISIS 863548, ISIS 863549, ISIS 863550, ISIS 863552 и ISIS 863553 считались переносимыми в данном исследовании и были отобраны для дальнейшей оценки.

Пример 4. Эффект антисмыслового подавления PCSK9 в модели на трансгенных мышах.

Модель на трансгенных мышах разрабатывали в UCI с применением геномной конструкции PCSK9 человека, которая содержалась в фосмиде ABC7-611722G24 и подвергалась рестрикции под действием NheI с получением фрагмента ДНК, содержащего всю геномную последовательность, а также 8 т. о. 5'-некодирующей и 0,4 т. о. 3'-некодирующей последовательности. Мышей, трансгенных по PCSK9, получали путем случайной вставки посредством микроинъекции в ядра. У потомства экспрессировалась mRNA PCSK9 человека в печени и секретировался белок плазмы крови PCSK9 человека.

В данной модели (называемой в данном документе Tg-мышами) оценивали эффективность олигонуклеотидов ISIS, конъюгированных с 3'-ТНА. Тестируемые олигонуклеотиды ISIS представлены в приведенной ниже таблице. "№ ISIS исходного соединения" указывает на олигонуклеотид ISIS, который был описан в вышеприведенных исследованиях и который конъюгировали с 3'-ТНА и тестировали в данном исследовании.

Таблица 24  
Олигонуклеотиды ISIS, тестируемые у Tg-мышей

№ ISIS	Последовательность	№ ISIS исходного соединения	SEQ ID NO
863413	GAGGTATCCCCGGCGG	466847	1096
863419	GTCTAGGAGATACACC	848323	1419
863424	CATTTTAAAGCTCAGC	848539	1297
863425	GACAAGTCGGAACCAT	848542	1528
863427	TTGAATGGTCAAATGC	848567	1145
863433	GGACATCGGCACATTG	848583	1223
863434	ACGGACATCGGCACAT	848584	377
863436	AGCTCAATAAAAGTCA	848593	763
863437	CGGAACAAGAGCTCAA	848596	994
863438	ACGGAACAAGAGCTCA	848597	1071
863439	CACGGAACAAGAGCTC	848598	1147
863441	GATGAGGGCCATCAGC	848618	1302
863444	CAGAAAGCTAAGCCTC	848630	1149
863445	CTAGATGCCATCCAGA	848632	455
863448	TCCTAGGTGATGGCTC	848649	1380
863452	GCGAATGTGTACCCTG	848670	691
863472	GGAAAAAGTTCCATGC	848736	926
863473	GTGATAACGGAAAAAG	848740	1233
863474	TGCCTTAGAAGCATCT	848748	619
863475	AAAGATAAATGTCTGC	848756	388
863477	GGCAACAGAGAGGACA	848761	1542
863479	AGCAAAACAGGTCTAG	848770	1158
863480	TTCAAGTTACAAAAGC	848771	1235
863481	CCCAGAATAAATATCT	848772	389
863482	TGCTACAAAACCCAGA	848774	1312
863483	CCAAATCGGAACCCAC	848790	1240

863484	CGAGAATACCTCCGCC	848795	549
863485	GCTGAGTAAGGACTTG	848811	550
863486	AGAAAGTCAAAGGCTC	848814	781
863489	TACATTCAGACGGTG	848832	939
863490	AATAATCTCATGTCAG	848833	1016
863491	AGGCAGTAATGGGCAA	848838	1243
863493	TCATGAATCAAGTCCA	848844	629
863494	CAAATTATAGCAGCCA	848849	1017
863495	AACAAATTATAGCAGC	848850	1092
863496	TCCAACACTGAGGACC	848854	1244
863497	CTACAAATGCAGGCAG	848875	554
863498	CTCGACAACAGGTTTT	848890	478
863499	ACCAAATGCGGACCAA	848898	1094
863502	GCAATTCGGTTTGTCC	848971	563
863506	GGAAAGGAACAGGCTC	849013	410
863507	CTCCACTGAAGAGGTC	849016	1411
863509	GACAATGAAGAGGAGA	849021	721
863510	GTTAAGAGTGCAGGGT	849030	1258
863511	ACAGAGAAATGCATGC	849036	645
863512	GTTATTATTGAATGGT	849040	955
863514	GTTAATAATGCCCCCG	849048	1413
863516	ACAACCTGGATACATTG	849071	881
863517	CAATAGGCATCTACCA	849084	648
863518	ACTCATCAATAGGCAT	849085	725
863520	CCTCAGGTGGAATCAG	849106	1111
863522	GGAGAATAACAGTGAT	849123	1188
863524	ATAGACAAGGAAAGGG	849135	885
863525	GTCTAGAAAAAGTCCT	849162	504
863526	AGGAAAGTCTCAGGGC	849169	1043
863527	CTGTAGGAAAGTCTCA	849171	1195
863531	ACAGCTGCTAGTTATT	849189	426
863533	TGCTACTGTCAACAGT	849205	427
863536	GGAAGATATTAGCAAT	849227	585
863537	GCGGATTCAGACTTG	849233	1047
863538	CAACATCAAATTCTGC	849236	353
863539	GAAGACGGAGTAAGGC	849239	1352
863541	TTCTAAGTGCCACGGG	849267	1203
863545	CTATCCTGTAGCATCA	849305	1516
863547	GGAGAAGTAAGGTCA	849331	1213
863548	AGGAGAAGTAAGGTCA	849332	367
863549	ATTTTAAAGCAACGGG	849345	1061
863550	CCTACATGCCAGCCTG	849354	523
863552	TCTGAACATGGTAGGG	849358	831
863553	GTAAGATGGAAAGAGA	849359	908

## Обработка.

Мышей, трансгенных по PCSK9, выдерживали в условиях цикла чередования 12 часов света и темноты и кормили стандартным кормом для мышей Purina без ограничений. Животных акклиматизировали в течение по меньшей мере 7 дней в исследовательской лаборатории перед началом эксперимента. Антисмысловые олигонуклеотиды (ASO) получали в забуференном солевом растворе (PBS) и стерилизовали путем фильтрации через фильтр с диаметром пор 0,2 микрона. Олигонуклеотиды растворяли в 0,9% PBS для инъекций.

Мыши, трансгенные по PCSK9, получали подкожные инъекции олигонуклеотида ISIS в дозе 2,5 мг/кг дважды в неделю в течение 2 недель. Две группы мышей получали подкожные инъекции PBS в течение 2 недель. Группы, получавшие инъекции солевого раствора, служили в качестве контрольных групп, с которыми сравнивали группы, обрабатываемые олигонуклеотидами.

## Биохимические маркеры плазмы крови.

Для оценки эффекта олигонуклеотидов ISIS в отношении функции печени и почек у этих мышей измеряли уровни трансаминаз (ALT и AST), холестерина (CHOL), холестерина HDL (HDL), холестерина LDL (LDL) и триглицеридов (TRIG) в плазме крови в день 12 с помощью автоматического клинико-биохимического анализатора (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, Нью-Йорк). Результаты представлены в приведенной ниже таблице. Из дальнейших исследований исключали олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения уровней каких-либо маркеров функции печени или почек, выходящие за пределы ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов.

Таблица 25

Биохимические маркеры плазмы крови в плазме крови Tg-мышей

Обработка	ALT (МЕ/л)	AST (МЕ/л)	CHOL (мг/дл)	HDL (мг/дл)	LDL (мг/дл)	TRIG (мг/дл)
PBS	17	37	114	73	35	65
PBS	23	102	105	68	32	76
863413	19	72	122	88	24	89
863419	15	44	115	73	31	104
863424	18	34	197	112	79	105
863425	25	53	143	101	36	104
863427	22	96	113	75	28	127
863433	17	54	92	67	19	61
863434	24	36	132	98	35	102
863436	17	50	124	81	31	96
863437	21	69	126	91	30	81
863438	18	66	57	39	15	54
863439	42	173	111	78	22	107
863441	20	57	84	58	20	56
863444	19	41	149	101	42	116
863445	20	36	169	111	48	111
863448	24	44	107	69	29	79

042765

863452	20	67	114	78	23	100
863472	35	55	105	71	26	89
863473	23	67	152	105	38	130
863474	21	115	118	78	32	45
863475	23	87	179	112	62	92
863477	67	142	222	137	73	69
863479	29	60	142	96	32	90
863480	19	52	122	88	25	53
863481	28	50	223	132	70	115
863482	20	43	168	105	46	129
863483	19	34	174	110	47	139
863484	25	71	64	38	21	66
863485	19	71	170	113	42	110
863486	18	40	117	78	28	121
863489	38	68	90	66	18	89
863490	19	41	99	71	19	113
863491	20	40	148	99	35	146
863493	18	74	107	73	26	59
863494	19	41	149	106	32	104
863495	17	34	136	95	32	116
863496	545	275	136	97	31	29
863497	36	49	121	84	28	53
863498	23	44	181	122	42	98
863499	21	51	128	102	18	58
863502	34	144	116	84	22	86
863506	30	44	188	119	51	108
863507	19	46	108	78	18	100
863509	23	63	121	80	28	115
863510	40	71	149	111	28	51

863511	31	61	101	70	23	83
863512	21	52	83	59	14	103
863514	22	65	99	69	23	64
863516	18	52	117	73	33	122
863517	25	98	113	74	27	125
863518	35	116	96	65	23	70
863520	21	102	107	68	31	76
863522	31	55	89	56	24	77
863524	49	61	154	104	43	94
863525	20	58	208	116	66	155
863526	32	82	159	114	37	59
863527	25	112	98	66	23	101
863531	835	454	268	149	67	84
863533	0	109	276	152	80	98
863536	22	68	120	75	28	181
863537	29	102	134	97	27	52
863538	16	42	126	76	39	89
863539	22	53	100	65	25	64
863541	19	41	98	66	23	115
863545	28	53	109	73	25	114
863547	22	41	119	80	30	71
863548	550	433	188	125	33	60
863549	17	36	109	70	33	72
863550	32	62	158	98	43	77
863552	18	55	113	71	33	79
863553	18	43	103	62	30	86

Пример 5. Переносимость олигонуклеотидов ISIS, нацеливающихся на PCSK9 человека, у мышей CD1.

Олигонуклеотиды ISIS, отобранные после вышеприведенных исследований, конъюгировали с концевой кэп-структурой 5'-трисгексиламино-(ТНА)-С6GalNAC3 (в дальнейшем называемой 5'-ТНА). Мыши CD1® (Charles River, Массачусетс) представляют собой многоцелевую мышиную модель, часто применяемую для тестирования безопасности и эффективности. Мышей обрабатывали антисмысловыми олигонуклеотидами ISIS, отобранными после исследований, описанных выше, и конъюгированными с 5'-ТНА, и оценивали в отношении изменений уровней различных биохимических маркеров плазмы крови.

Исследование 1.

Обработка.

Группы самцов мышей CD1 получали подкожную инъекцию 15 мг/кг олигонуклеотидов ISIS один раз в неделю в течение 6 недель. Одна группа самцов мышей CD1 получала подкожную инъекцию PBS один раз в неделю в течение 6 недель. Мышей подвергали эвтаназии через 48 ч после последней дозы, а органы и плазму крови собирали для дальнейшего анализа.

Тестируемые олигонуклеотиды ISIS представлены в приведенной ниже таблице. "№ ISIS неконъюгированного исходного соединения" относится к олигонуклеотиду ISIS, описанному в вышеприведенных исследованиях *in vitro*, который имеет такую же последовательность. "№ ISIS аналога, конъюгированного с 3'-ТНА" относится к олигонуклеотиду, конъюгированному с 3'-ТНА, который имеет такую же последовательность и оценивался выше в исследовании на трансгенных мышях.

Таблица 26

Олигонуклеотиды ISIS, тестируемые в исследовании переносимости у мышей CD1

№ ISIS	№ ISIS неконъюгированного исходного соединения	№ ISIS аналога, конъюгированного с 3'-ТНА	Последовательность	SEQ ID NO
863576	848583	863433	GGACATCGGCACATT G	122 3
863633	848833	863490	AATAATCTCATGTCA G	101 6
863655	849040	863512	GTTATTATTGAATGGT	955
863670	849171	863527	CTGTAGGAAAGTCTC A	119 5
863681	849236	863538	CAACATCAAATTCTG C	353

Биохимические маркеры плазмы крови.

Для оценки эффекта олигонуклеотидов ISIS в отношении функции печени и почек измеряли уровни трансаминаз, билирубина, креатинина и BUN в плазме крови с помощью автоматического клинико-биохимического анализатора (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, Нью-Йорк). Результаты представлены в приведенной ниже таблице. Обработка с помощью олигонуклеотидов ISIS не вызывала каких-либо изменений уровней каких-либо маркеров функции печени или почек, выходящих за пределы ожидаемого диапазона для бессмысленных олигонуклеотидов.

Таблица 27

Биохимические маркеры плазмы крови в плазме крови мышей CD1 в день 45

	ALT (МЕ/л)	AST (МЕ/л)	ALB (г/дл)	BUN (мг/дл)	CRE (мг/дл)	TBIL (мг/дл)
PBS	25	41	2,6	20,1	0,07	0,13
ISIS 863576	125	134	2,8	24,5	0,10	0,14
ISIS 863633	35	60	2,6	21,8	0,10	0,14
ISIS 863655	77	84	2,4	20,0	0,06	0,13
ISIS 863670	25	61	2,7	22,5	0,09	0,15
ISIS 863681	27	47	2,8	26,5	0,12	0,14

Гематологические анализы.

Кровь, полученную от всех групп мышей, анализировали в отношении числа RBC, WBC, тромбоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов, а также уровней гемоглобина, HCT и MCV. Результаты представлены в приведенной ниже таблице. Обработка с помощью олигонуклеотидов ISIS не вызывала каких-либо изменений уровней каких-либо гематологических маркеров, выходящих за пределы ожидаемого диапазона для бессмысленных олигонуклеотидов.

Таблица 28  
Число клеток крови у мышей CD1 в день 45

	RBC	Тромбоциты	WBC	Нейтрофилы (x 10 <sup>3</sup> /мкл)	Лимфоциты (x 10 <sup>3</sup> /мкл)	Моноциты (x 10 <sup>3</sup> /мкл)
	(x 10 <sup>6</sup> /мкл)	(x 10 <sup>3</sup> /мкл)	(x 10 <sup>3</sup> /мкл)			
PBS	9,0	1288	11,3	12,6	9128	515
863576	8,3	1251	9,4	18,8	6643	316
863633	9,4	1338	10,1	13,5	8009	698
863655	8,9	1320	8,0	10,0	5919	473
863670	9,7	1335	8,3	21,3	6514	402
863681	9,5	1329	7,6	11,0	6376	310

Таблица 29  
Гематологические маркеры у мышей CD1 в день 45

	Гемоглобин (г/дл)	HCT (%)	MCV (фл)
PBS	14,0	43	48
863576	12,9	40	48
863633	14,6	45	49
863655	14,1	44	50
863670	14,7	44	46
863681	14,6	45	47

Измерения массы тела и органов.

Для оценки эффекта олигонуклеотидов ISIS в отношении общего состояния здоровья животных измеряли показатели массы тела и органов. Показатели массы тела измеряли каждую неделю, и они представлены в приведенной ниже таблице. Измеряли показатели массы органов, и данные также представлены в приведенной ниже таблице. Результаты указывают на то, что эффект обработки с помощью антисмысловых олигонуклеотидов в отношении показателей массы тела и органов находился в пределах ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов.

Таблица 30  
Показатели массы тела (г) у мышей CD1

	Исходный уровень (день 1)	Неделя 1 (день 8)	Неделя 2 (день 15)	Неделя 3 (день 22)	Неделя 4 (день 29)	Неделя 5 (день 36)	Неделя 6 (день 43)
PBS	46	48	49	48	50	49	49
863576	29	33	35	36	38	38	39
863633	27	32	33	34	36	37	39
863655	28	33	33	35	37	38	39
863670	27	31	32	33	36	36	38
863681	28	33	33	35	37	38	40

Таблица 31  
Показатели массы органов (г) у мышей CD1

	Печень	Селезенка	Почка
PBS	2,25	0,16	0,63
863576	2,32	0,19	0,59
863633	2,25	0,11	0,50
863655	2,55	0,15	0,61
863670	1,89	0,11	0,51
863681	2,25	0,10	0,47

Исследование 2.  
Обработка.

Группы самцов мышей CD1 получали подкожную инъекцию 15 мг/кг олигонуклеотидов ISIS один раз в неделю в течение 6 недель. Одна группа самцов мышей CD1 получала подкожную инъекцию PBS один раз в неделю в течение 6 недель. Мышей подвергали эвтаназии через 48 ч после последней дозы, а органы и плазму крови собирали для дальнейшего анализа.

Тестируемые олигонуклеотиды ISIS представлены в приведенной ниже таблице. "№ ISIS неконъюгированного исходного соединения" относится к олигонуклеотиду ISIS, описанному в вышеприведенных исследованиях *in vitro*, который имеет такую же последовательность. "№ ISIS аналога, конъюгированного с 3'-ТНА" относится к олигонуклеотиду, конъюгированному с 3'-ТНА, который имеет такую же последовательность и описан выше в исследовании на трансгенных мышах.

Таблица 32  
Олигонуклеотиды ISIS, тестируемые в исследовании переносимости у мышей CD1

№ ISIS	№ ISIS неконъюгированного исходного соединения	№ ISIS аналога, конъюгированного с 3'-ТНА	Последовательность	SEQ ID NO
863568	848542	863425	GACAAGTCGGAACCA T	152 8
863581	848597	863438	ACGGAACAAGAGCTC A	107 1
863582	848598	863439	CACGGAACAAGAGCT C	114 7
863587	848630	863444	CAGAAAGCTAAGCCT C	114 9

Биохимические маркеры плазмы крови.

Для оценки эффекта олигонуклеотидов ISIS в отношении функции печени и почек измеряли уровни трансаминаз, билирубина, креатинина и BUN в плазме крови с помощью автоматического клинико-биохимического анализатора (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, Нью-Йорк).

Результаты представлены в приведенной ниже таблице. Обработка с помощью олигонуклеотидов ISIS не вызывала каких-либо изменений уровней каких-либо маркеров функции печени или почек, выходящих за пределы ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов.

Таблица 33

Биохимические маркеры плазмы крови в плазме крови мышей CD1 в день 45

	ALT (МЕ/л)	AST (МЕ/л)	ALB (г/дл)	BUN (мг/дл)	CRE (мг/дл)	TBIL (мг/дл)
PBS	25	51	2,6	25,8	0,10	0,12
ISIS 863568	72	67	2,6	20,4	0,10	0,14
ISIS 863581	74	77	2,7	25,0	0,10	0,14
ISIS 863582	71	89	2,8	24,4	0,11	0,13
ISIS 863587	60	60	2,5	24,6	0,11	0,10

Гематологические анализы.

Кровь, полученную от всех групп мышей, анализировали в отношении числа RBC, WBC, тромбоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов, а также уровней гемоглобина, HCT и MCV. Результаты представлены в приведенной ниже таблице. Обработка с помощью олигонуклеотидов ISIS не вызывала каких-либо изменений уровней каких-либо гематологических маркеров, выходящих за пределы ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов.

Таблица 34

Число клеток крови у мышей CD1 в день 45

	RBC ( $\times 10^6$ /мкл)	Тромбоциты ( $\times 10^3$ /мкл)	WBC ( $\times 10^3$ /мкл)	Нейтрофилы ( $\times 10^3$ /мкл)	Лимфоциты ( $\times 10^3$ /мкл)	Моноциты ( $\times 10^3$ /мкл)
PBS	9,6	853	3,9	12	3174	129
863568	10,3	859	7,8	15	6060	347
863581	9,4	812	8,0	17	6162	359
863582	9,1	868	10,5	21	6671	713
863587	9,6	903	9,8	10	8233	344

Таблица 35

Гематологические маркеры у мышей CD1 в день 45

	Гемоглобин (г/дл)	HCT (%)	MCV (фл)
PBS	14,5	44	46
863568	16,2	47	46
863581	14,5	43	46
863582	13,5	41	45
863587	15,0	45	47

Измерения массы тела и органов.

Для оценки эффекта олигонуклеотидов ISIS в отношении общего состояния здоровья животных измеряли показатели массы тела и органов. Показатели массы тела измеряли каждую неделю, и они представлены в приведенной ниже таблице. Измеряли показатели массы органов, и данные также представлены в приведенной ниже таблице. Результаты указывают на то, что эффект обработки с помощью антисмысловых олигонуклеотидов в отношении показателей массы тела и органов находился в пределах

ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов.

Таблица 36

## Показатели массы тела (г) у мышей CD1

	Исходный уровень (день 1)	Неделя 1 (день 9)	Неделя 2 (день 16)	Неделя 3 (день 23)	Неделя 4 (день 30)	Неделя 5 (день 37)	Неделя 6 (день 43)
PBS	30	33	36	36	37	39	39
863568	29	32	34	34	36	39	38
863581	29	33	35	36	36	39	39
863582	31	34	36	36	37	40	41
863587	30	35	37	37	39	41	43

Таблица 37

## Показатели массы органов (г) у мышей CD1

	Печень	Селезенка	Почка
PBS	2,06	0,11	0,59
863568	2,46	0,10	0,54
863581	2,23	0,13	0,56
863582	2,52	0,16	0,63
863587	2,94	0,16	0,64

## Исследование 3.

## Обработка.

Группы самцов мышей CD1 получали подкожную инъекцию 5 мг/кг или 15 мг/кг олигонуклеотидов ISIS один раз в неделю в течение 6 недель. Одна группа самцов мышей CD1 получала подкожную инъекцию PBS один раз в неделю в течение 6 недель. Мышей подвергали эвтаназии через 48 ч после последней дозы, а органы и плазму крови собирали для дальнейшего анализа.

Тестируемые олигонуклеотиды ISIS представлены в приведенной ниже таблице. "№ ISIS неконъюгированного исходного соединения" относится к олигонуклеотиду ISIS, описанному в вышеприведенных исследованиях *in vitro*, который имеет такую же последовательность. "№ ISIS аналога, конъюгированного с 3'-ТНА" относится к олигонуклеотиду, конъюгированному с 3'-ТНА, который имеет такую же последовательность и описан выше в исследовании на трансгенных мышах.

Таблица 38

## Олигонуклеотиды ISIS, тестируемые в исследовании переносимости у мышей CD1

№ ISIS	№ ISIS неконъюгированного исходного соединения	№ ISIS аналога, конъюгированного с 3'-ТНА	Последовательность	SEQ ID NO
845219	466847	863413	GAGGTATCCCCGGCGG	109 6
863577	848584	863434	ACGGACATCGGCACAT	377
863579	848593	863436	AGCTCAATAAAAGTCA	763
863637	848849	863494	CAAATTATAGCAGCCA	101 7
863682	849239	863539	GAAGACGGAGTAAGG C	135 2

## Биохимические маркеры плазмы крови.

Для оценки эффекта олигонуклеотидов ISIS в отношении функции печени и почек измеряли уровни трансаминаз, билирубина, креатинина и BUN в плазме крови с помощью автоматического клинико-биохимического анализатора (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, Нью-Йорк).

Результаты представлены в приведенной ниже таблице. Из дальнейших исследований исключали олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения уровней каких-либо маркеров функции печени или

почек, выходящие за пределы ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов.

Таблица 39

Биохимические маркеры плазмы крови в плазме крови мышей CD1 в день 45

	Доза (мг/кг)	ALT (МЕ/л)	AST (МЕ/л)	ALB (г/дл)	BUN (мг/дл)	CRE (мг/дл)	TBIL (мг/дл)
PBS	-	26	62	2,5	19,5	0,08	0,18
845219	5	96	64	2,4	19,3	0,08	0,15
	15	187	115	2,3	22,0	0,07	0,17
863577	5	176	160	2,5	17,2	0,09	0,13
	15	621	492	2,5	15,6	0,10	0,20
863579	5	50	50	2,5	19,9	0,10	0,13
	15	87	70	2,4	20,3	0,11	0,13
863637	5	321	301	1,7	19,3	0,05	0,19
	15	508	472	2,4	20,5	0,09	0,22
863682	5	306	156	2,3	20,0	0,06	0,13
	15	373	212	2,4	21,0	0,06	0,14

Гематологические анализы.

Кровь, полученную от всех групп мышей, анализировали в отношении числа RBC, WBC, тромбоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов, а также уровней гемоглобина, HCT и MCV. Результаты представлены в приведенной ниже таблице. Из дальнейших исследований исключали олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения уровней каких-либо гематологических маркеров, выходящие за пределы ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов.

Таблица 40

Число клеток крови у мышей CD1 в день 45

	Доза (мг/кг)	RBC ( $\times 10^6$ /мкл)	Тромбоциты ( $\times 10^3$ /мкл)	WBC ( $\times 10^3$ /мкл)	Нейтрофилы ( $\times 10^3$ /мкл)	Лимфоциты ( $\times 10^3$ /мкл)	Моноциты ( $\times 10^3$ /мкл)
PBS	-	9,4	1218	8,8	13	7078	367
845219	5	9,4	1349	7,2	13	5749	444
	15	9,3	1263	7,2	13	5664	511
863577	5	9,2	1401	8,0	17	5851	650
	15	8,2	1299	10,0	10	7718	1034
863579	5	10,0	1252	9,0	16	6876	587
	15	9,6	1256	8,2	11	6645	415
863637	5	9,0	956	5,7	14	4266	448
	15	9,3	843	6,8	13	5044	696
863682	5	9,4	1040	5,9	13	4581	447
	15	9,0	800	8,3	8	6757	694

Таблица 41

Гематологические маркеры у мышей CD1 в день 45

	Доза (мг/кг)	Гемоглобин (г/дл)	HCT (%)	MCV (фл)
PBS	-	14,1	45	48
845219	5	14,2	45	49
	15	13,8	43	46
863577	5	13,9	45	49

	15	12,2	39	48
863579	5	14,9	47	48
	15	15,3	48	50
863637	5	13,5	42	47
	15	13,8	43	47
863682	5	14,5	45	48
	15	13,6	43	48

Измерения массы тела и органов.

Для оценки эффекта олигонуклеотидов ISIS в отношении общего состояния здоровья животных измеряли показатели массы тела и органов. Показатели массы тела измеряли каждую неделю, и они представлены в приведенной ниже таблице. Измеряли показатели массы органов, и данные также представлены в приведенной ниже таблице. Результаты указывают на то, что эффект обработки с помощью антисмысловых олигонуклеотидов в отношении показателей массы тела и органов находился в пределах ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов.

Таблица 42  
Показатели массы тела (г) у мышей CD1

	Доза (мг/кг)	Исходный уровень (день 1)	Неделя 1 (день 8)	Неделя 2 (день 15)	Неделя 3 (день 22)	Неделя 4 (день 29)	Неделя 5 (день 36)	Неделя 6 (день 42)
PBS	-	27	30	32	32	33	35	35
845219	5	28	33	34	35	37	40	39
	15	29	33	34	35	36	38	38
863577	5	26	31	32	33	34	37	35
	15	27	31	31	32	34	36	35
863579	5	28	32	33	32	36	38	36
	15	27	32	33	32	36	38	37
863637	5	28	33	34	35	36	37	38
	15	27	32	34	34	36	38	38
863682	5	26	32	33	32	35	37	36
	15	27	31	32	33	34	36	36

Таблица 43  
Показатели массы органов (г) у мышей CD1

	Доза (мг/кг)	Печень	Селезенка	Почка
PBS	-	1,84	0,08	0,50
845219	5	2,42	0,13	0,54
	15	2,41	0,15	0,54
863577	5	2,47	0,11	0,58
	15	2,62	0,15	0,59
863579	5	2,53	0,13	0,57
	15	2,82	0,12	0,54
863637	5	2,38	0,17	0,52
	15	2,67	0,22	0,58
863682	5	1,79	0,11	0,54
	15	2,13	0,21	0,53

Пример 6. Переносимость олигонуклеотидов ISIS, нацеливающихся на PCSK9 человека, у крыс линии Спрег-Доули.

Крысы линии Спрег-Доули представляют собой многоцелевую модель, используемую для оценивания безопасности и эффективности. Крыс обрабатывали антисмысловыми олигонуклеотидами ISIS из исследований, описанных в примерах выше, и оценивали в отношении изменений уровней различных биохимических маркеров плазмы крови.

## Обработка.

Крыс линии Спрег-Доули выдерживали в условиях цикла чередования 12 часов света и темноты и кормили стандартным кормом для крыс Purina, рационом 5001, без ограничений. Группы крыс линии Спрег-Доули по 4 особи в каждой получали подкожную инъекцию 15 мг/кг олигонуклеотида ISIS один раз в неделю в течение 6 недель. Через 48 ч после последней дозы крыс подвергали эвтаназии, а органы и плазму крови собирали для дальнейшего анализа.

## Функция печени.

Для оценки эффекта олигонуклеотидов ISIS в отношении функции печени измеряли уровни трансаминаз в плазме крови с помощью автоматического клинико-биохимического анализатора (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, Нью-Йорк). Измеряли уровни ALT (аланинтрансаминазы) и AST (аспартат-трансаминазы) в плазме крови, и результаты, выраженные в МЕ/л, представлены в приведенной ниже таблице. Также измеряли уровни билирубина (TBIL), BUN, альбумина (ALB) и креатинина (CRE) в плазме крови с помощью того же самого клинико-биохимического анализатора, и результаты, выраженные в мг/дл, также представлены в приведенной ниже таблице. Также измеряли уровни альбумина в плазме крови с помощью того же самого клинико-биохимического анализатора, и результаты, выраженные в г/дл, также представлены в приведенной ниже таблице.

Таблица 44

## Маркеры функции печени у крыс линии Спрег-Доули

	ALT (МЕ/л)	AST (МЕ/л)	ALB (г/дл)	BUN (мг/дл)	CRE (мг/дл)	TBIL (мг/дл)
PBS	20	64	3,1	13	0,2	0,1
863568	40	70	3,5	14	0,2	0,2
863576	39	94	3,7	16	0,3	0,1
863579	33	91	3,3	14	0,2	0,1
863581	36	154	2,8	18	0,3	0,2
863582	38	122	2,9	20	0,3	0,1
863587	38	87	3,0	12	0,2	0,1
863633	26	78	3,0	16	0,3	0,1
863655	27	84	3,1	15	0,2	0,1
863670	30	91	3,2	15	0,2	0,1
863681	29	81	3,2	14	0,2	0,1

## Функция почек.

Для оценки эффекта олигонуклеотидов ISIS в отношении функции почек измеряли уровни креатинина крови и общего белка в моче с помощью автоматического клинико-биохимического анализатора (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, Нью-Йорк). Результаты, выраженные в мг/дл, представлены в приведенной ниже таблице. Из дальнейших исследований исключали олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения уровней каких-либо маркеров функции почек, выходящие за пределы ожидаемого диапазона для анти-смысловых олигонуклеотидов. "N/A" указывает на то, что данные для этой группы отсутствуют.

Таблица 45

## Маркеры функции почек (мг/дл) у крыс линии Спрег-Доули

	CRE (мг/дл)	TP (мг/дл)
PBS	79	59
863568	111	137
863576	N/A	N/A
863579	93	117
863581	54	75
863582	71	91
863587	64	86
863633	100	85
863655	85	117
863670	89	104
863681	144	142

Показатели массы тела и органов.

Для оценки эффекта олигонуклеотидов ISIS в отношении общего состояния здоровья животных измеряли показатели массы тела и органов. Показатели массы тела измеряли каждую неделю, и они представлены в приведенной ниже таблице. Измеряли показатели массы органов, и данные также представлены в приведенной ниже таблице. Результаты указывают на то, что эффект обработки с помощью антисмысловых олигонуклеотидов в отношении показателей массы тела и органов находился в пределах ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов.

Таблица 46

Показатели массы тела (г)

	Исходный уровень (день 1)	Неделя 1 (день 8)	Неделя 2 (день 15)	Неделя 3 (день 22)	Неделя 4 (день 29)	Неделя 5 (день 36)	Неделя 6 (день 43)
PBS	201	267	344	389	433	451	470
863568	200	265	334	371	404	419	435
863576	272	327	361	389	417	424	435
863579	264	313	357	379	407	420	430
863581	195	258	329	361	397	411	430
863582	204	273	350	387	423	440	458
863587	205	273	353	398	439	459	474
863633	271	319	361	377	401	406	417
863655	195	256	330	366	406	417	435
863670	189	249	319	351	384	394	406
863681	275	312	364	386	415	426	435

Таблица 47

Показатели массы органов (г)

	Печень	Селезенка	Почка
PBS	12	0,8	3,4
863568	16	1,2	3,3
863576	12	1,3	3,0
863579	11	1,0	3,0
863581	13	2,0	3,1
863582	14	2,1	3,5
863587	14	1,1	3,4
863633	12	1,6	3,2
863655	11	1,7	3,4
863670	12	1,0	2,9
863681	12	1,1	3,3

Пример 7. Эффект антисмыслового подавления PCSK9 в модели на трансгенных мышах.

Модель на трансгенных мышах была разработана в UCI и никогда не была описана в литературе. Геномную конструкцию PCSK9 человека, содержащуюся в фосмиде ABC7-611722G24, подвергали рестрикции под действием NheI с получением фрагмента ДНК, содержащего всю геномную последовательность, а также 8 т. о. 5'-некодирующей и 0,4 т. о. 3'-некодирующей последовательности. Мышей, трансгенных по PCSK9, получали путем случайной вставки посредством микроинъекции в ядра. У потомства экспрессировалась mRNA PCSK9 человека в печени и секретировался белок плазмы крови PCSK9 человека.

Обработка.

Трансгенных мышей выдерживали в условиях цикла чередования 12 часов света и темноты и кормили стандартным кормом для мышей Purina без ограничений. Животных акклиматизировали в течение по меньшей мере 7 дней в исследовательской лаборатории перед началом эксперимента. Антисмысловые олигонуклеотиды (ASO) получали в забуференном солевом растворе (PBS) и стерилизовали путем фильтрации через фильтр с диаметром пор 0,2 микрона. Олигонуклеотиды растворяли в 0,9% PBS для инъек-

ций.

Tg-мышей разделяли на 27 групп по 3 мыши в каждой. Группы получали подкожные инъекции олигонуклеотида ISIS в дозе 0,25 мг/кг, 1,00 мг/кг или 5,00 мг/кг один раз в неделю в течение 4 недель. Одна группа из 4 мышей получала подкожные инъекции PBS один раз в неделю в течение 4 недель. Группа, получавшая инъекции солевого раствора, служила в качестве контрольной группы, с которой сравнивали группы, обработанные олигонуклеотидами.

Анализ РНК.

В день 26 РНК экстрагировали из печени для ПЦР-анализа в реальном времени с целью измерения экспрессии mRNA PCSK9. Результаты представлены в виде процентного изменения уровня mRNA по сравнению с контрольным PBS, нормализованного с помощью RIBOGREEN®. Как показано в приведенной ниже таблице, обработка с помощью антисмысловых олигонуклеотидов ISIS приводила к значительному снижению уровня mRNA PCSK9 по сравнению с контрольным PBS.

Таблица 48

Процент подавления mRNA PCSK9 в печени трансгенных мышей по сравнению с контрольным PBS

	Еженедельная доза (мг/кг)	% подавления	ED <sub>50</sub>
863568	0,25	26	0,5
	1	76	
	5	95	
863579	0,25	9	1,4
	1	41	
	5	84	
863581	0,25	12	0,6
	1	73	
	5	80	
863582	0,25	32	0,5
	1	71	
	5	91	
863587	0,25	27	0,5
	1	71	
	5	87	
863633	0,25	60	0,2
	1	96	
	5	99	
863655	0,25	37	0,3
	1	94	
	5	99	
863670	0,25	0	1,0
	1	62	
	5	87	
863681	0,25	25	0,9
	1	45	
	5	94	

Анализ белка.

Белок плазмы крови PCSK9 измеряли с помощью набора для ELISA, предназначенного специально для человека (R&D Systems). Результаты представлены в виде процентного изменения уровней белка по сравнению с контрольным PBS. Как показано в приведенной ниже таблице, обработка с помощью антисмысловых олигонуклеотидов ISIS приводила к значительному снижению уровней белка плазмы крови PCSK9 по сравнению с контрольным PBS.

Таблица 49  
 Процент подавления белка плазмы крови PCSK9 у трансгенных мышей  
 по сравнению с контрольным PBS

	Еженедельная доза (мг/кг)	% подавления	ED <sub>50</sub>
863568	0,25	37	0,4
	1	74	
	5	97	
863579	0,25	5	1,5
	1	41	
	5	81	
863581	0,25	31	0,6
	1	59	
	5	91	
863582	0,25	25	0,5
	1	73	
	5	95	
863587	0,25	33	0,4
	1	77	
	5	93	
863633	0,25	50	0,3
	1	97	
	5	99	
863655	0,25	44	0,3
	1	93	
	5	99	
863670	0,25	23	1,6
	1	38	
	5	72	
863681	0,25	28	0,8
	1	54	
	5	89	

Уровни холестерина LDL.

Уровни холестерина LDL в плазме крови измеряли с помощью автоматического клинико-биохимического анализатора (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, Нью-Йорк). Также измеряли уровни белка рецептора LDL (LDLr) в печени. Результаты представлены в виде процентного изменения уровней по сравнению с контрольным PBS. Как показано в приведенной ниже таблице, обработка с помощью нескольких антисмысловых олигонуклеотидов ISIS приводила к значительному снижению уровней холестерина LDL в плазме крови по сравнению с контрольным PBS. Соответственно, наблюдали, что обработка с помощью антисмысловых олигонуклеотидов ISIS приводила к дозозависимому увеличению уровней белка LDLr печени у мышей.

Таблица 50  
 Подавление уровней холестерина LDL в плазме крови по сравнению с контрольным PBS

	<b>Еженедельная доза (мг/кг)</b>	<b>% подавления</b>
863568	0,25	7
	1	41
	5	59
863579	0,25	0
	1	15
	5	33
863581	0,25	30
	1	17
	5	41
863582	0,25	23
	1	28
	5	50
863587	0,25	20
	1	38
	5	38
863633	0,25	27
	1	66
	5	71
863655	0,25	29
	1	58
	5	74
863670	0,25	19
	1	0
	5	39
863681	0,25	21
	1	23
	5	35

Таблица 51

Процентное увеличение уровня LDLг печени у трансгенных мышей по сравнению с контрольным PBS

	Еженедельная доза (мг/кг)	% увеличения
863568	0,25	3
	1	61
	5	245
863579	0,25	-46
	1	-5
	5	132
863581	0,25	-44
	1	6
	5	73
863582	0,25	-19
	1	93
	5	191
863587	0,25	-6
	1	-10
	5	95
863633	0,25	-22
	1	131
	5	269
863655	0,25	0
	1	129
	5	207
863670	0,25	9
	1	81
	5	78
863681	0,25	123
	1	360
	5	222

Пример 8. Измерение вязкости антисмысловых олигонуклеотидов, нацеливающихся на PCSK9 человека.

Вязкость антисмысловых олигонуклеотидов, отобранных после исследований, описанных выше, измеряли с целью отсеивания антисмысловых олигонуклеотидов, которые обладают вязкостью более 40 сантипуазов (сП). Олигонуклеотиды, обладающие вязкостью более 40 сП, будут характеризоваться менее чем оптимальной вязкостью.

Олигонуклеотиды (32-35 мг) отвешивали в стеклянный флакон, добавляли 120 мкл воды, а антисмысловый олигонуклеотид растворяли в растворе путем нагревания флакона при 50°C. Часть (75 мкл) предварительно нагретого образца отмеряли пипеткой в микровязкозиметр (Cambridge). Температуру в микровязкозиметре устанавливали на 25°C и измеряли вязкость образца. Другую часть (20 мкл) предварительно нагретого образца отмеряли пипеткой в 10 мл воды для считывания показаний в UV-диапазоне при 260 нм и 85°C (прибор Cary UV). Результаты представлены в приведенной ниже таблице, где концентрация каждого антисмыслового олигонуклеотида составляла 350 мг/мл, и указывают на то, что все растворы антисмысловых олигонуклеотидов обладали оптимальной вязкостью в соответствии с критерием, приведенным выше.

Таблица 52

Вязкость антисмысловых олигонуклеотидов, нацеливающихся на PCSK9 человека

№ ISIS	Вязкость (сП)	Концентрация (мг/мл)
863568	39	325
863576	20	325
863579	19	325
863581	25	300
863582	17	300
863587	14	325
863633	12	325
863655	10	325
863670	21	325
863681	15	325

Пример 9. Эффект антисмысловых олигонуклеотидов ISIS, нацеливающихся на PCSK9 человека, у макаков-крабоедов.

Макаков-крабоедов обрабатывали антисмысловыми олигонуклеотидами ISIS, отобранными после исследований, описанных в примерах выше. Оценивали эффективность и переносимость антисмысловых олигонуклеотидов, а также их фармакокинетический профиль в печени и почках.

На момент проведения данного исследования геномная последовательность макака-крабоеда отсутствовала в базе данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI); поэтому нельзя было подтвердить перекрестную реактивность с последовательностью гена макака-крабоеда. Вместо этого последовательности антисмысловых олигонуклеотидов ISIS, которые применяли у макаков-крабоедов, сравнивали с последовательностью макака-резуса в отношении гомологии. Ожидается, что олигонуклеотиды ISIS, гомологичные последовательности макака-резуса, также в полной мере перекрестно реагируют с последовательностью макака-крабоеда. Тестируемые антисмысловые олигонуклеотиды человека перекрестно реагируют с геномной последовательностью макака-резуса (последовательностью, комплементарной последовательности с № доступа в GENBANK NW\_005092960.1 с отсеченными нуклеотидами 83474000-83501000, обозначенной в данном документе как SEQ ID NO: 1544). Чем большей является комплементарность между олигонуклеотидом человека и последовательностью макака-резуса, тем большей является вероятность того, что олигонуклеотид человека может перекрестно реагировать с последовательностью макака-резуса. Стартовые сайты и стоп-сайты для каждого олигонуклеотида, нацеливающегося на SEQ ID NO: 1544, представлены в приведенной ниже таблице. "Стартовый сайт" указывает на самый крайний 5'-концевой нуклеотид, на который нацеливается гЭПМер, в последовательности гена макака-резуса.

Таблица 53

Антисмысловые олигонуклеотиды, комплементарные геномной последовательности PCSK9 макака-резуса (SEQ ID NO: 1544)

№ ISIS	Стартовый сайт-мишень	Несовпадения	Стоп-сайт-мишень	SEQ ID NO
863568	25252	1	25267	1528
863579	25510	2	25525	763
863581	25520	1	25535	1071
863582	25521	1	25536	1147
863587	25712	2	25727	1149
863633	3911	0	3926	353
863655	10464	1	10479	1195
863670	15306	0	15321	1223
863681	17270	0	17285	955

Обработка.

До начала исследования обезьян содержали на карантине, в течение которого проводили ежеднев-

ное обследование общего состояния здоровья у животных. Обезьяны имели возраст 2-4 года и массу тела 2-4 кг. Девять групп по 5 случайным образом распределенных самцов макаков-крабоедов в каждой получали подкожные инъекции олигонуклеотида ISIS или PBS с переходом по часовой стрелке между четырьмя различными участками на спинах обезьян (т.е. левой частью, правой частью, верхней частью и нижней частью) в каждый день введения дозы; по одному участку на дозу. Обезьянам вводили дозу 10 мг/кг олигонуклеотида ISIS два раза в неделю (дни 1, 5, 9 и 14) в течение первых двух недель, а после этого один раз в неделю в течение 10 недель (в дни 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 и 84). Контрольная группа из 5 макаков-крабоедов получала инъекции PBS аналогичным образом и служила в качестве контрольной группы.

В течение периода исследования обезьян обследовали два раза в день в отношении признаков заболевания или дистресса. Любое животное, у которого проявлялись более чем кратковременные или слабые боль или дистресс вследствие обработки, повреждение или болезнь, получало от сотрудников-ветеринаров лечение одобренными обезболивающими или болеутоляющими средствами после консультации с руководителем исследования. Любое животное, имеющее неудовлетворительное состояние здоровья или находящееся в возможном агональном состоянии, определяли для дополнительного контроля и возможной эвтаназии. Запланированную эвтаназию животных проводили в день 86 примерно через 48 ч после введения дозы путем кровопускания в условиях глубокой анестезии. Протоколы, описанные в данном примере, были одобрены Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию (IACUC).

Снижение уровня мишени.

Анализ РНК.

В день 86 РНК экстрагировали из печени для ПЦР-анализа в реальном времени с целью измерения экспрессии mRNA PCSK9. Результаты представлены в виде процентного изменения уровня mRNA по сравнению с контрольным PBS, нормализованного с помощью RIBOGREEN®. Как показано в приведенной ниже таблице, обработка с помощью антисмысловых олигонуклеотидов ISIS 863633, ISIS 863670 и ISIS 863681, которые не имели несовпадений с геном макака-резуса, приводила к значительному снижению уровня mRNA PCSK9 по сравнению с контрольным PBS.

Таблица 54

Процент подавления mRNA PCSK9 в печени макака-крабоеда по сравнению с контрольным PBS

	% подавления
863655	46
863633	88
863568	74
863579	35
863582	55
863581	53
863587	36
863670	84
863681	87

Анализ белка.

Примерно 1 мл крови собирали от всех доступных животных в день -7 (до обработки), дни 16, 30, 58 и 86 (примерно через 48 ч после введения дозы в дни 14, 28, 56 и 84 соответственно) и помещали в пробирки, содержащие калиевую соль EDTA. Пробирки центрифугировали (3000 об/мин в течение 10 мин при 4°C) для получения плазмы крови. Результаты представлены в приведенной ниже таблице в виде процентного значения увеличения или уменьшения относительно уровней в день -7 (уровней до обработки). Как показано в приведенной ниже таблице, обработка с помощью антисмысловых олигонуклеотидов ISIS 863633, ISIS 863670 и ISIS 863681, которые не имели несовпадений с геном макака-резуса, приводила к значительному снижению уровней белка PCSK9.

Ткань печени также анализировали в отношении уровней индуцирования уровней белков-рецепторов LDL (LDLr). Результаты представлены в приведенной ниже таблице. Данные демонстрируют, что обработка с помощью трех антисмысловых олигонуклеотидов, гомологичных геномной последовательности макака-резуса, приводила к индуцированию белка LDLr печени спустя 12 недель лечения.

Таблица 55

Уровни белков плазмы крови (% от уровней до обработки) у макаков-крабоедов

	День 16	День 30	День 86
PBS	34	36	18
863655	-13	-2	-36
863633	-90	-91	-91
863568	-19	-14	-22
863579	34	36	18
863582	8	2	35
863581	16	8	11
863587	-3	1	-12
863670	-79	-83	-86
863681	-80	-82	-86

Таблица 56

Уровни белка LDLг печени (% от контрольного PBS) у макаков-крабоедов

	% увеличения
863655	98
863633	399
863568	243
863579	163
863582	115
863581	156
863587	158
863670	521
863681	417

Уровни липидов в плазме крови.

Для оценки эффекта олигонуклеотидов ISIS в отношении уровней общего холестерина, холестерина LDL, холестерина HDL и триглицеридов обезьянам не давали пищу в течение ночи до взятия крови. Примерно 1,7 мл образцов крови забирали у всех исследуемых групп. Кровь собирали в пробирки без антикоагулянта для отделения сыворотки крови. Пробирки выдерживали при комнатной температуре в течение не менее 90 мин, а затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре для получения сыворотки крови. Уровни измеряли с помощью биохимического анализатора Toshiba 200FR NEO (Toshiba Co., Япония). Данные демонстрируют, что обработка с помощью трех бессмысловых олигонуклеотидов, гомологичных геномной последовательности макака-резуса, приводила к значительному снижению уровней общего холестерина и холестерина LDL в плазме крови. Как и ожидалось, снижение уровней PCSK9 человека не влияло на уровни холестерина HDL или триглицеридов в плазме крови.

Таблица 57

Уровни липидов в плазме крови (мг/дл) у макаков-крабоедов в день 86

	Общий холестерин	Холестерин LDL	Холестерин HDL	Триглицериды
PBS	146	37	110	71
863655	152	73	71	46
863633	115	17	99	57
863568	128	32	99	51
863579	109	44	71	45
863582	137	38	103	37
863581	174	51	122	34
863587	140	45	102	35
863670	95	17	83	45
863681	109	19	99	29

Исследования переносимости.

Клинико-биохимические параметры.

Для оценки эффекта олигонуклеотидов ISIS в отношении функции печени обезьянам не давали пищу в течение ночи до взятия крови. Примерно 1,7 мл образцов крови забирали у всех исследуемых групп. Кровь собирали в пробирки без антикоагулянта для отделения сыворотки крови. Пробирки выдерживали при комнатной температуре в течение не менее 90 мин, а затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре для получения сыворотки крови. Уровни общего билирубина (TBIL), аспартатаминотрансферазы (AST), аланинаминотрансферазы (ALT) и альбумина (ALB) измеряли с помощью биохимического анализатора Toshiba 200FR NEO (Toshiba Co., Япония). Результаты указывают на то, что антисмысловые олигонуклеотиды не оказывают эффекта в отношении функции печени, выходящего за пределы ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов. В частности, наблюдали, что ISIS 863633 хорошо переносится.

Таблица 58

Биохимические маркеры плазмы крови у макаков-крабоедов в день 86

	ALT (МЕ/л)	AST (МЕ/л)	Билирубин (мг/дл)	ALB (г/дл)
PBS	65	64	0,2	4,1
863655	63	59	0,3	3,5
863633	47	70	0,3	4,0
863568	44	64	0,3	4,1
863579	50	52	0,2	4,1
863582	42	57	0,2	4,2
863581	55	61	0,3	4,2
863587	110	76	0,3	3,9
863670	42	64	0,3	4,1
863681	62	60	0,3	4,1

Функция почек.

Для оценки эффекта олигонуклеотидов ISIS в отношении функции почек обезьянам не давали пищу в течение ночи до взятия крови. Примерно 1,7 мл образцов крови забирали у всех исследуемых групп. Кровь собирали в пробирки без антикоагулянта для отделения сыворотки крови. Пробирки выдерживали при комнатной температуре в течение не менее 90 мин, а затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре для получения сыворотки крови. Уровни BUN и креатинина измеряли с помощью биохимического анализатора Toshiba 200FR NEO (Toshiba Co., Япония). Результаты, выраженные в мг/дл, представлены в приведенной ниже таблице.

Данные биохимического анализа плазмы крови указывают на то, что большинство олигонуклеотидов ISIS не оказывали какой-либо эффект в отношении функции почек, выходящий за пределы ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов. В частности, наблюдали, что ISIS 863633 хорошо переносится.

Таблица 59  
Уровни BUN и креатинина в плазме крови (мг/дл) у макаков-крабоедов в день 86

	BUN	Креатинин
PBS	31	0,8
863655	26	0,8
863633	27	0,8
863568	27	0,9
863579	24	0,8
863582	24	0,8
863581	27	0,8
863587	24	0,8
863670	26	1,0
863681	23	0,8

#### Гематология.

Для оценки каких-либо эффектов олигонуклеотидов ISIS у макаков-крабоедов в отношении гематологических параметров примерно 0,5 мл крови собирали у каждого из доступных исследуемых животных в пробирки, содержащие K<sub>2</sub>-EDTA. Образцы анализировали в отношении числа эритроцитов (RBC), числа лейкоцитов (WBC), числа отдельных разновидностей лейкоцитов, как, например, моноцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, а также в отношении числа тромбоцитов, содержания гемоглобина и гематокрита с помощью гематологического анализатора ADVIA120 (Bayer, США). Данные представлены в приведенных ниже таблицах.

Данные указывают на то, что олигонуклеотиды не вызывали каких-либо изменений гематологических параметров, выходящих за пределы ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов в такой дозе. В частности, наблюдали, что ISIS 863633 хорошо переносится.

Таблица 60  
Число клеток крови у макаков-крабоедов в день 86

	RBC (x 10 <sup>6</sup> /мкл)	Тромбоциты (x 10 <sup>3</sup> /мкл)	WBC (x 10 <sup>3</sup> /мкл)	Нейтрофилы (x 10 <sup>3</sup> /мкл)	Лимфоциты (x 10 <sup>3</sup> /мкл)	Моноциты (x 10 <sup>3</sup> /мкл)
PBS	5,5	340	9,0	3,1	5,4	0,3
863655	5,6	361	9,7	3,7	5,4	0,3
863633	5,6	395	11,4	4,5	6,5	0,3
863568	5,8	409	12,1	602	5,4	0,3
863579	5,9	390	8,0	2,2	5,3	0,3
863582	5,6	333	8,9	3,0	5,5	0,3
863581	5,8	382	8,2	2,4	5,3	0,3
863587	6,0	348	8,8	2,3	6,0	0,2
863670	5,4	417	10,7	4,3	5,9	0,3
863681	5,6	408	9,0	3,1	5,5	0,2

Таблица 61  
Гематологические параметры у макаков-крабоедов в день 86

	Гемоглобин (г/дл)	HCT (%)
PBS	12,8	45
863655	13,0	43
863633	12,9	43
863568	13,0	44
863579	13,5	46
863582	12,4	43

863581	13,0	44
863587	13,5	46
863670	12,7	43
863681	12,7	43

В целом результаты исследования указывают на то, что ISIS 863633 является наиболее эффективным и хорошо переносимым соединением из тех, которые тестировали в отношении подавления PCSK9, и является важным кандидатом для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, в частности, для снижения уровней холестерина LDL.

Пример 10. Сравнительное подавление антисмысловыми олигонуклеотидами, нацеливающимися на PCSK9 человека, в анализе зависимости ответа от дозы.

Неконъюгированные исходные олигонуклеотиды из антисмысловых олигонуклеотидов, тестируемых в исследовании на обезьянах, сравнивали с ранее сконструированными соединениями. ISIS 848542, ISIS 848593, ISIS 848597, ISIS 848598, ISIS 848630, ISIS 848833, ISIS 849040, ISIS 849171 и ISIS 849236 тестировали в отношении эффективности вместе с ISIS 405879 и ISIS 405995, которые были ранее определены как одни из наиболее эффективных антисмысловых соединений *in vitro* (см., например, патент США 8084437), а также ISIS 431131 и ISIS 480604, которые были ранее описаны в патенте США 9127276.

Клетки высевали при плотности 10000 клеток на лунку, а в среду добавляли антисмысловый олигонуклеотид в концентрациях 39,1 нМ, 156,25 нМ, 625 нМ, 2500 нМ и 10000 нМ для свободного поглощения олигонуклеотида клетками. После периода обработки, составлявшего примерно 48 ч, РНК выделяли из клеток, и измеряли уровни mRNA PCSK9 с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Для измерения уровней mRNA использовали набор праймеров и зондов для PCSK9 человека от ABI (ID № Hs03037355\_m1). Уровни mRNA PCSK9 корректировали в соответствии с общим содержанием РНК, измеренным с помощью RIBOGREEN®. Результаты представлены в виде процента подавления PCSK9 по сравнению с необработанными контрольными клетками.

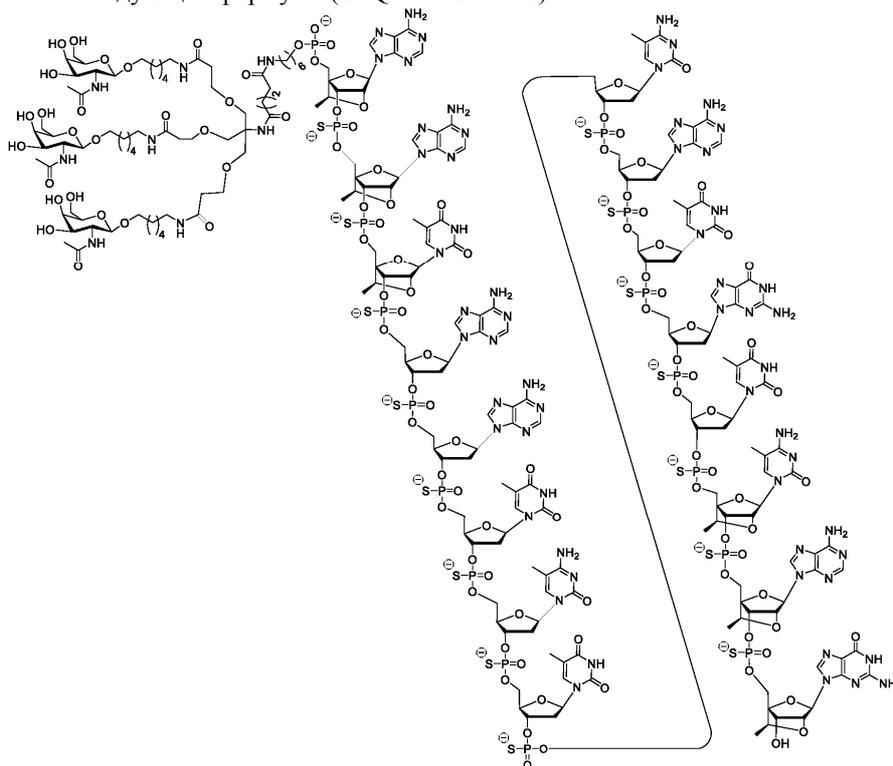
Также представлена концентрация полумаксимального подавления ( $IC_{50}$ ) для каждого олигонуклеотида. Уровни mRNA PCSK9 снижались дозозависимым образом в клетках, обработанных антисмысловым олигонуклеотидом. ISIS 848542, ISIS 848593, ISIS 848597, ISIS 848598, ISIS 848630, ISIS 848833, ISIS 849040, ISIS 849171 и ISIS 849236 демонстрировали лучшую эффективность по сравнению со всеми ранее раскрытыми олигонуклеотидами.

Таблица 62

№ ISIS	39,1 нМ	156,25 нМ	625,0 нМ	2500,0 нМ	10000,0 нМ	$IC_{50}$ (мкМ)
405879	0	0	0	0	0	>10
405995	0	0	0	0	0	>10
431131	0	3	0	0	5	>10
480604	0	1	19	31	36	>10
848542	9	37	70	83	88	0,4
848593	19	36	51	53	69	1,1
848597	41	67	78	86	91	0,04
848598	41	64	76	85	90	0,1
848630	0	17	59	79	85	0,9
848833	4	66	88	93	94	0,2
849040	41	93	98	99	98	<0,03
849171	0	52	86	94	96	0,3
849236	0	26	71	89	95	0,6

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

## 1. Соединение следующей формулы (SEQ ID NO: 1016)



или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.
3. Соединение по п.1, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой калиевую соль.
4. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль, состоящее из модифицированного олигонуклеотида длиной 16 связанных нуклеозидов, имеющего нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1016, где модифицированный олигонуклеотид содержит:
  - гэп-сегмент, состоящий из десяти связанных дезоксирибонуклеозидов;
  - 5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов; и
  - 3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов;
 где гэп-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, где каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит сEt-сахар; где каждая межнауклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную связь; и где каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.
5. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль, содержащее модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину 16 связанных нуклеозидов, который имеет последовательность нуклеиновых оснований, состоящую из SEQ ID NO: 1016, где модифицированный олигонуклеотид содержит:
  - гэп-сегмент, состоящий из связанных дезоксирибонуклеозидов;
  - 5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из связанных нуклеозидов; и
  - 3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из связанных нуклеозидов;
 где гэп-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, где 5'-концевой фланговый сегмент и 3'-концевой фланговый сегмент содержат сEt-сахара; где каждая межнауклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную связь; и где каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.
6. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-5 в терапии.
7. Применение по п.6 в лечении, предупреждении или уменьшении выраженности заболевания, ассоциированного с PCSK9.
8. Применение по п.7, где заболевание представляет собой гиперхолестеринемию, дислипидемию или смешанную дислипидемию.

