

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046118**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.02.07**

**(51)** Int. Cl. **C12N 15/113** (2010.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**202091693**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.01.11**

---

**(54) АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ, ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННО  
ВОЗДЕЙСТВУЮЩИЕ НА АЛЬФА-СИНУКЛЕИН, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

**(31)** 62/616,994

**(32)** 2018.01.12

**(33)** US

**(43)** 2021.04.14

**(86)** PCT/US2019/013255

**(87)** WO 2019/140236 2019.07.18

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ  
КОМПАНИ (US); РОШЕ  
ИННОВЕЙШН СЕНТЕР  
КОПЕНГАГЕН А/С (DK)**

**(56)** WO-A2-2012068405

DATABASE Geneseq [Online], 5 July 2012 (2012-07-05), "Human SCNA mRNA targeted modified antisense oligonucleotide, SEQ ID 86.", XP002789806, retrieved from EBI accession no. GSN:AZW45015, Database accession no. AZW45015, sequence

DATABASE Geneseq [Online], 5 July 2012 (2012-07-05), "Human SCNA mRNA targeted modified antisense oligonucleotide, SEQ ID 11.", XP002789807, retrieved from EBI accession no. GSN:AZW44940, Database accession no. AZW44940, sequence

WO-A2-2007031081

WO-A1-2016079181

WO-A2-2005004794

**(72)** Изобретатель:

**Олсон Ричард Е., Какасе Анджела М.,  
Мердит Джери Е., Мл., Девидзе  
Нино, Лой Джеймс К., Болдик Карл  
Дж., Пендри Аннапурна, Макдональд  
Айвар М. (US), Хагедорн Питер,  
Дженсен Марианне Лербех (DK)**

**(74)** Представитель:

**Гизатуллин Ш.Ф., Глухарёва А.О.,  
Строкова О.В., Угрюмов В.М. (RU)**

---

**(57)** Настоящее изобретение относится к антисмысловым олигонуклеотидам, которые оказывают целенаправленное воздействие на мРНК SNCA (например, в месте соединения интрона и экзона) в клетке, что приводит к пониженной экспрессии белка SNCA. Снижение экспрессии белка SNCA является благоприятным для лечения определенных медицинских нарушений, например неврологического нарушения.

---

**046118**

**B1**

**046118**  
**B1**

### **Ссылка на перечень последовательностей, предоставленный в электронной форме**

Содержание предоставленного в электронной форме перечня последовательностей (название: 3338.109PC01\_SequenceListing\_ST25.txt, размер: 13817 байт; и дата создания: 10 января 2019 года), предоставленного в данной заявке, включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### **Область техники, к которой относится настоящее изобретение**

Настоящее раскрытие относится к антисмысловым олигомерным соединениям (ASO), которые оказывают целенаправленное воздействие на место соединения интрона и экзона в транскрипте альфа-синуклеина (SNCA) в клетке, что приводит к пониженной экспрессии белка альфа-синуклеина (SNCA). Снижение экспрессии белка SNCA может оказывать благоприятное воздействие на ряд медицинских нарушений, таких как мультисистемная атрофия, болезнь Паркинсона, деменция при болезни Паркинсона (PDD) и деменция с тельцами Леви.

### **Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

Альфа-синуклеин (SNCA), член семейства белков-синуклеинов, представляет собой небольшой растворимый белок, который экспрессируется преимущественно в тканях нервной системы. См., Marques O et al., Cell Death Dis. 19: e350 (2012). Он экспрессируется во многих типах клеток, но преимущественно локализуется в пресинаптических терминалях нейронов. Хотя точную его функцию еще предстоит выяснить, предполагают, что SNCA играет важную роль в регуляции синаптической передачи. Например, SNCA функционирует в качестве молекулярного шаперона в образовании комплексов SNARE, которые опосредуют докинг синаптических пузырьков с пресинаптическими мембранами нейтронов. SNCA также может взаимодействовать с другими белками, подобными ассоциированному с микротрубочками белку тау, что помогает стабилизировать микротрубочки и регулировать перемещение пузырьков.

Вследствие роли SNCA в регуляции синаптической передачи изменения экспрессии и/или функционирования SNCA могут нарушать критически важные биологические процессы. Считается, что такие нарушения вносят вклад в  $\alpha$ -синуклеопатии, которые представляют собой нейродегенеративные заболевания, характеризующиеся аномальным накоплением агрегатов белка SNCA в головном мозге. Соответственно, нерастворимые включения из неправильно свернутого, агрегированного и фосфорилированного белка SNCA являются патологическим маркером для таких заболеваний, как болезнь Паркинсона (PD), деменция при болезни Паркинсона (PDD), деменция с тельцами Леви (DLB) и мультисистемная атрофия (MSA). См., Galvin JE et al., Archives of Neurology 58: 186-190 (2001); и Valera E et al., J Neurochem 139 Suppl 1: 346-352 (Oct. 2016).

$\alpha$ -Синуклеопатии, такие как болезнь Паркинсона, представляют собой широко распространенные прогрессирующие нейродегенеративные нарушения головного мозга, особенно, среди пожилых людей. См., Recchia A et al., FASEB J. 18: 617-26 (2004). Согласно оценкам примерно от семи до десяти миллионов людей во всем мире живут с такими нарушениями, причем только в Соединенных Штатах Америки каждый год регистрируют приблизительно 60000 новых случаев. Затраты на лечение для отдельного лица могут легко превышать 2500 долларов за год, а терапевтическая хирургическая операция может стоить вплоть до 100000 долларов для пациента. Таким образом, существует большая потребность в более надежных и экономически эффективных вариантах лечения.

### **Краткое раскрытие настоящего изобретения**

Настоящее раскрытие направлено на антисмысловой олигонуклеотид (ASO), содержащий непрерывную нуклеотидную последовательность длиной 10-30 нуклеотидов, которые являются комплементарными последовательности нуклеиновой кислоты в пределах транскрипта альфа-синуклеина (SNCA), причем последовательность нуклеиновой кислоты содержит нуклеотиды 7592-7637 в SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит нуклеотиды 7602-7627 в SEQ ID NO: 1. В соответствии с другими вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты соответствует нуклеотидам 7603-7620 в SEQ ID NO: 1. В соответствии с определенными вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты соответствует нуклеотидам 7604-7620 в SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления транскрипт SNCA содержит SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления непрерывная нуклеотидная последовательность содержит последовательность, представленную любым из SEQ ID NO: 4-21, с одним, двумя, тремя или четырьмя несовпадениями. В соответствии с другими вариантами осуществления непрерывная нуклеотидная последовательность содержит последовательность, представленную любым из SEQ ID NO: 4-21. В соответствии с определенными вариантами осуществления непрерывная нуклеотидная последовательность содержит SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 7.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антисмысловой олигонуклеотид согласно настоящему раскрытию является способным к ингибированию экспрессии транскрипта человеческого SNCA в клетке, которая экспрессирует транскрипт человеческого SNCA.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления непрерывная нуклеотидная последовательность содержит по меньшей мере один нуклеотидный аналог. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антисмысловой олигонуклеотид представляет собой гэнмер. В соответствии с дру-

гими вариантами осуществления антисмысловой олигонуклеотид представляет собой гэпмер с чередующимися нуклеотидами во фланкирующих участках. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антисмысловой олигонуклеотид, который раскрыт в данном документе, имеет формулу 5'-A-B-C-3', в которой (i) участок B представляет собой непрерывную последовательность по меньшей мере из 6 звеньев ДНК, которые способны привлекать РНКазу; (ii) участок A представляет собой последовательность первого крыла из 1-10 нуклеотидов, причем последовательность первого крыла содержит один или несколько нуклеотидных аналогов и, необязательно, одно или несколько звеньев ДНК, и при этом по меньшей мере один из нуклеотидных аналогов расположен на 3'-конце A; и (iii) участок C представляет собой последовательность второго крыла из 1-10 нуклеотидов, причем последовательность второго крыла содержит один или несколько нуклеотидных аналогов и, необязательно, одно или несколько звеньев ДНК, и при этом по меньшей мере один из нуклеотидных аналогов расположен на 5'-конце C. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок A содержит комбинацию нуклеотидных аналогов и звеньев ДНК, выбранную из (i) 1-10 нуклеотидных аналогов и 0 звеньев ДНК; (ii) 1-9 нуклеотидных аналогов и 1 звена ДНК; (iii) 1-8 нуклеотидных аналогов и 1-2 звеньев ДНК; (iv) 1-7 нуклеотидных аналогов и 1-3 звеньев ДНК; (v) 1-6 нуклеотидных аналогов и 1-4 звеньев ДНК; (vi) 1-5 нуклеотидных аналогов и 1-5 звеньев ДНК; (vii) 1-4 нуклеотидных аналогов и 1-6 звеньев ДНК; (viii) 1-3 нуклеотидных аналогов и 1-7 звеньев ДНК; (ix) 1-2 нуклеотидных аналогов и 1-8 звеньев ДНК и (x) 1 нуклеотидного аналога и 1-9 звеньев ДНК. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок C содержит комбинацию нуклеотидных аналогов и звеньев ДНК, выбранную из (i) 1-10 нуклеотидных аналогов и 0 звеньев ДНК; (ii) 1-9 нуклеотидных аналогов и 1 звена ДНК; (iii) 1-8 нуклеотидных аналогов и 1-2 звеньев ДНК; (iv) 1-7 нуклеотидных аналогов и 1-3 звеньев ДНК; (v) 1-6 нуклеотидных аналогов и 1-4 звеньев ДНК; (vi) 1-5 нуклеотидных аналогов и 1-5 звеньев ДНК; (vii) 1-4 нуклеотидных аналогов и 1-6 звеньев ДНК; (viii) 1-3 нуклеотидных аналогов и 1-7 звеньев ДНК; (ix) 1-2 нуклеотидных аналогов и 1-8 звеньев ДНК и (x) 1 нуклеотидного аналога и 1-9 звеньев ДНК. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок A представляет собой схему первого крыла, выбранную из любых ASO на фиг. 2 и 3, и/или участок C представляет собой схему второго крыла, выбранную из любых ASO на фиг. 2 и 3, причем заглавная буква представляет собой нуклеозидный аналог, и строчная буква представляет собой ДНК.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антисмысловой олигонуклеотид согласно настоящему раскрытию содержит по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять или по меньшей мере десять нуклеотидных аналогов. В соответствии с определенными вариантами осуществления нуклеотидный аналог или аналоги представляют собой один или несколько нуклеозидов с модифицированным сахаром, выбранных из группы, состоящей из закрытой нуклеиновой кислоты (LNA); 2'-O-алкил-РНК; 2'-амино-ДНК; 2'-фтор-ДНК; арабинонуклеиновой кислоты (ANA); 2'-фтор-ANA, гекситолнуклеиновой кислоты (HNA), интеркалирующей нуклеиновой кислоты (INA), конформационно затрудненного этилового аналога нуклеозида (сEt), 2'-O-метил-нуклеиновой кислоты (2'-OMe), 2'-O-метоксиэтил нуклеиновой кислоты (2'-MOE) и любой их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нуклеотидный аналог или аналоги содержат бициклический сахар. В соответствии с определенными вариантами осуществления бициклический сахар содержит сEt, 2',4'-стерически затрудненный 2'-O-метоксиэтил (сMOE), LNA,  $\alpha$ -L-LNA, P-D-LNA, 2'-O,4'-C-этиленмостиковые нуклеиновые кислоты (ENA), аминокислоты-LNA, окси-LNA или тио-LNA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нуклеотидный аналог или аналоги содержат LNA.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит одно или несколько 5'-метилцитозиновых нуклеотидных оснований. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит от двух до пяти LNA на 5'-участке антисмыслового олигонуклеотида. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит от двух до пяти LNA на 3'-участке антисмыслового олигонуклеотида.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антисмысловой олигонуклеотид характеризуется переносимостью *in vivo*, меньшей или равной общей оценке 4, причем общая оценка представляет собой сумму балльных оценок по пяти категориям, которые представляют собой 1) гиперактивность; 2) пониженную активность и возбуждение; 3) двигательную дисфункцию и/или атаксию; 4) ненормальное положение тела и дыхание и 5) тремор и/или конвульсии, и при этом балльную оценку по каждой категории измеряют по шкале 0-4. В соответствии с определенными вариантами осуществления переносимость *in vivo* является меньшей или равной общей оценке 3, общей оценке 2, общей оценке 1 или общей оценке 0.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антисмысловой олигонуклеотид снижает экспрессию мРНК SNCA в клетке по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 90% или приблизительно на 100% по сравнению с клеткой, не подвергающейся воздействию антисмыслового олигонуклеотида. В соответствии с

другими вариантами осуществления антисмысловой олигонуклеотид снижает экспрессию белка SNCA в клетке по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 90% или по меньшей мере приблизительно на 95% по сравнению с клеткой, не подвергающейся воздействию антисмыслового олигонуклеотида.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит нуклеотиды А, Т, С и G и по меньшей мере один аналог нуклеотидов А, Т, С и G и имеет оценку последовательности, большую или равную 0,2, причем оценку последовательности рассчитывают с помощью формулы I:

$$\frac{\text{кол-во нуклеотидов С и их аналогов} - \text{кол-во нуклеотидов G и их аналогов}}{\text{общая длина в нуклеотидах}} \quad (I)$$

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антисмысловой олигонуклеотид имеет длину от 10 до 24 нуклеотидов или имеет длину от 14 до 21 нуклеотида.

В соответствии с другими вариантами осуществления антисмысловой олигонуклеотид имеет длину 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 нуклеотид.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нуклеотидная последовательность антисмыслового олигонуклеотида содержит, состоит, по существу, из или состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-21, со схемой, выбранной из группы, состоящей из схем на фиг. 2 и 3, причем заглавная буква представляет собой нуклеозид с модифицированным сахаром, и строчная буква представляет собой ДНК. В соответствии с определенными вариантами осуществления нуклеотидная последовательность содержит, состоит, по существу, из или состоит из SEQ ID NO: 15 со схемой ASO-005459 и SEQ ID NO: 7 со схемой ASO-005578 или ASO-005584. В соответствии с другими вариантами осуществления нуклеотидная последовательность содержит, состоит, по существу, из или состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-21, с соответствующей химической структурой на фиг. 2 и 3. В соответствии с определенными вариантами осуществления нуклеотидная последовательность содержит, состоит, по существу, из или состоит из ASO-005459, ASO-005578 и ASO-005584. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию имеет молекулярную формулу  $C_{171}H_{214}N_{56}O_{90}P_{16}S_{16}$ . В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO имеет молекулярную формулу  $C_{182}H_{229}N_{58}O_{96}P_{17}S_{17}$ . В соответствии с другими вариантами осуществления ASO имеет молекулярную формулу  $C_{181}H_{227}N_{58}O_{96}P_{17}S_{17}$ . В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антисмысловой олигонуклеотид согласно настоящему раскрытию содержит межнуклеозидный мостик, выбранный из: фосфодизэфирного мостика, фосфотриэфирного мостика, метилфосфонатного мостика, фосфорамидатного мостика, фосфоротиоатного мостика и их комбинаций. В соответствии с определенными вариантами осуществления межнуклеозидный мостик содержит один или несколько определяемых стереохимической структурой модифицированных фосфатных мостиков.

Настоящее раскрытие также относится к конъюгату, содержащему антисмысловой олигонуклеотид, который раскрыт в данном документе, причем антисмысловой олигонуклеотид является ковалентно прикрепленным по меньшей мере к одному нуклеотидному фрагменту или фрагменту, отличному от полинуклеотида. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нуклеотидный фрагмент или фрагмент, отличный от полинуклеотида, содержит белок, цепь жирной кислоты, сахарный остаток, гликопротеин, белок или любые их комбинации.

В данном документе также представлена фармацевтическая композиция, содержащая антисмысловой олигонуклеотид или конъюгат, которые раскрыты в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция дополнительно содержит терапевтическое средство. В соответствии с определенными вариантами осуществления терапевтическое средство представляет собой антагонист альфа-синуклеина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антагонист альфа-синуклеина представляет собой антитело к альфа-синуклеину или его фрагмент.

Настоящим раскрытием дополнительно предусмотрен набор, содержащий антисмысловой олигонуклеотид, конъюгат или композицию, которые раскрыты в данном документе. Также раскрыт диагностический набор, содержащий антисмысловой олигонуклеотид, конъюгат или композицию согласно настоящему раскрытию. Настоящее раскрытие также направлено на способ ингибирования или снижения экспрессии белка SNCA в клетке, причем способ предусматривает введение антисмыслового олигонуклеотида, конъюгата или композиции, которые раскрыты в данном документе, в клетку, экспрессирующую белок SNCA, причем экспрессия белка SNCA в клетке ингибируется или снижается после введения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антисмысловой олигонуклеотид ингибирует или снижает экспрессию мРНК SNCA в клетке после введения. В соответствии с определенными вариантами осуществления экспрессия мРНК SNCA снижена по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 90% или прибли-

тельно на 100% после введения по сравнению с клеткой, не подвергающейся воздействию антисмыслового олигонуклеотида. В соответствии с другими вариантами осуществления антисмысловой олигонуклеотид снижает экспрессию белка SNCA в клетке после введения по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80% или по меньшей мере приблизительно на 90% по сравнению с клеткой, не подвергающейся воздействию антисмыслового олигонуклеотида. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка представляет собой нейрон.

В данном документе представлен способ лечения синуклеопатии у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий введение эффективного количества антисмыслового олигонуклеотида, конъюгата или композиции согласно настоящему раскрытию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления синуклеопатия является выбранной из группы, состоящей из болезни Паркинсона, деменции при болезни Паркинсона (PDD), мультисистемной атрофии, деменции с тельцами Леви и любых их комбинаций. В данном документе также представлено применение антисмыслового олигонуклеотида, конъюгата или композиции согласно настоящему раскрытию для производства лекарственного препарата. Настоящее раскрытие также относится к применению антисмыслового олигонуклеотида, конъюгата или композиции для производства лекарственного препарата для лечения синуклеопатии у субъекта, нуждающегося в этом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антисмысловой олигонуклеотид, конъюгат или композиция согласно настоящему раскрытию предназначены для применения в терапии синуклеопатии у субъекта, нуждающегося в этом. В соответствии с другими вариантами осуществления антисмысловой олигонуклеотид, конъюгат или композиция согласно настоящему раскрытию предназначены для применения в терапии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект представляет собой человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антисмысловой олигонуклеотид, конъюгат или композицию вводят перорально, парентерально, интратекально, в желудочки головного мозга, легочно, местно или интравентрикулярно. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нуклеотидный аналог содержит нуклеозид с модифицированным сахаром. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нуклеозид с модифицированным сахаром представляет собой усиливающий аффинность нуклеозид с модифицированным сахаром.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1A, 1B и 1C представлена геномная последовательность (частичная) альфа-синуклеина, последовательности мРНК и белка альфа-синуклеина. Последовательность на фиг. 1A представляет собой частичную геномную последовательность SNCA (т.е. остатки с 6001 по 8400 в SEQ ID NO: 1). SEQ ID NO: 1 является идентичной последовательности пре-мРНК SNCA за исключением того, что нуклеотид "t" в SEQ ID NO: 1 показан как "u" в пре-мРНК. SEQ ID NO: 2 на фиг. 1B представляет последовательность мРНК SNCA за исключением того, что нуклеотид "t" в SEQ ID NO: 2 показан как "u" в мРНК. На фиг. 1C представлена последовательность белка SNCA (SEQ ID NO: 3).

На фиг. 2 показаны иллюстративные ASO, целенаправленно воздействующие на место соединения интрона и экзона в пре-мРНК SNCA. Каждый столбец на фиг. 2 показывает ID номер последовательности (SEQ ID No.), назначенный только для этой последовательности, положения начала и конца участка-мишени на последовательности пре-мРНК SNCA, положения начала и конца участка-мишени на последовательности мРНК SNCA, номер схемы (DES No.), последовательность ASO со схемой, номер ASO (ASO No.) и последовательность ASO с химической структурой.

На фиг. 3 показаны ASO, целенаправленно воздействующие на место соединения интрона и экзона в пре-мРНК SNCA, с иллюстративной модификацией схемы крыла. Каждый столбец на фиг. 3 показывает ID номер последовательности (SEQ ID No.), назначенный только для этой последовательности, положения начала и конца участка-мишени на последовательности пре-мРНК SNCA, номер схемы (DES No.), последовательность ASO со схемой, номер ASO (ASO No.) и последовательность ASO с химической структурой и идентифицированной модификацией схемы крыла. DES-316392, DES-316393, DES-316394 и DES-316395 показывают различные схемы ASO, возможные для SEQ ID NO: 7. DES-287031, DES-287957, DES-287959, DES-287962, DES-288906 и DES-313413 показывают различные схемы ASO, возможные для SEQ ID NO: 12. DES-319536, DES-319537, DES-325058, DES-325059, DES-325060, DES-325061, DES-325062, DES-325063, DES-325064, DES-325065, DES-325066, DES-325067, DES-325068 и DES-325069 показывают различные схемы ASO, возможные для SEQ ID NO: 14. DES-324636, DES-324637, DES-324638, DES-324639, DES-324640, DES-324641, DES-324642, DES-324643, DES-324644, DES-324645, DES-324646 и DES-324647 показывают различные схемы ASO, возможные для SEQ ID NO: 15. В случае схем ASO заглавными буквами обозначены нуклеотидные аналоги (например, LNA или 2'-О-метил (OMe)), а строчными буквами обозначены нуклеотиды ДНК. Заглавные буквы с подчеркиванием или без подчеркивания указывают, что две буквы могут представлять собой отличающиеся нуклеотидные аналоги, например, LNA и 2'-О-метил. Например, подчеркнутые заглавные буквы могут представлять собой 2'-О-метил, в то время как заглавные буквы без подчеркивания представляют собой LNA. В столбце с химической структурой ASO OMe представляет собой 2'-О-метил-нуклеозид, L представляет собой LNA, D представляет собой ДНК, и числа после L или D означают количество нуклеотидов LNA или ДНК.

На фиг. 4 представлено выраженное в процентах снижение экспрессии белка SNCA как в клеточной линии нейробластомы человека SK-N-BE(2) ("SK клетки"), так и в первичных нейронах, выделенных из трансгенных мышей A53T-PAC ("PAC нейроны") после культивирования *in vitro* с различными ASO, как описано в примере 2A для PAC нейронов и в примере 2E для SK клеток. В случае SK клеток клетки обрабатывали 25 мкМ ASO, и экспрессия мРНК SNCA (нормализованная к GAPDH) показана в виде процента от значения для контроля. В случае PAC нейронов клетки обрабатывали либо 40 нМ, либо 5 мкМ ASO, и экспрессия белка SNCA (нормализованная к тубулину) показана в виде процентного ингибирования. В случае, когда значение не представлено, конкретный ASO не подвергали исследованию в конкретных условиях.

На фиг. 5 показана активность различных ASO в снижении экспрессии белка SNCA в первичных нейронах, выделенных из A53T-PAC трансгенных мышей, *in vitro*. Как описано в примере 2A, PAC нейроны культивировали *in vitro* с 10 последовательно снижающимися концентрациями различных ASO, и активность (IC<sub>50</sub>) ASO показана в виде соотношения экспрессии SNCA и тубулина (мкМ).

На фиг. 6 показана оценка переносимости ("Tox Score") и выраженное в процентах снижение (или нокдаун "KD") экспрессии мРНК SNCA и белка SNCA у обработанных ASO A53T-PAC трансгенных мышей или мышей WT (дикого типа) (см. пример 4). Оценки переносимости представлены для 1 суток (1D) и 28 суток (28D) после введения ASO. Выраженное в процентах снижение экспрессии мРНК SNCA и белка SNCA показано для 3 суток и 28 суток после введения ASO в гиппокампе (Hippo), стволе мозга (BS) и полосатом теле (Str).

На фиг. 7A и 7B показано воздействие ASO-005459 на экспрессию белка SNCA и тубулина (Tub) в первичных нейронах, выделенных из A53T-PAC трансгенных мышей. Нейроны обрабатывали 10 последовательно снижающимися концентрациями ASO-005459 и измеряли количества белка SNCA и тубулина. Показано выраженное в процентах ингибирование в виде соотношения  $\alpha$ -синуклеин/тубулин (фиг. 7A) и уровни тубулина (фиг. 7B). Каждая точка данных на графике представляет собой отдельную повторность.

На фиг. 8 представлено воздействие ASO-005459 на уровень экспрессии мРНК SNCA (круг), белка S (альфа) (PROS1 (квадрат)) и тубулина (TUBB3 (треугольник)) в человеческих нейронах. Нейроны обрабатывали различными концентрациями ASO-005459 в течение 6 суток, а затем уровни мРНК измеряли с помощью анализа QUANTIGENE®. Уровень экспрессии мРНК показан в виде процента от значения для контроля. Показанные данные представляют собой среднее значение  $\pm$ SD от определения в двух повторностях.

На фиг. 9 показаны уровни экспрессии мРНК SNCA в гиппокампе у A53T-PAC мышей через трое суток после ICV введения 100 мкг ASO-005459 (незакрашенный квадрат) или контрольной среды (закрашенный круг). Уровни экспрессии мРНК SNCA измеряли с помощью qRT-PCR, нормализовали к мРНК GAPDH, а затем выражали относительно среднего уровня экспрессии в группе со средой. Горизонтальной линией обозначено эталонное значение, составляющее 1 (т.е. значение, при котором экспрессия мРНК SNCA будет эквивалентной уровню экспрессии, наблюдаемому в контрольной группе со средой). Показанные данные представляют собой среднее значение  $\pm$ SD от определения в двух повторностях. Показанные статистические данные основываются на однофакторном дисперсионном анализе с апостериорным критерием Даннета. \*\*\*  $p < 0,001$ .

На фиг. 10A и 10B показано сравнение средней массы тела мышей, обработанных ASO-005459. На фиг. 10A A53T-PAC мыши получали дозы 3,13 мкг, 12,5 мкг, 25 мкг или 50 мкг ASO-005459, и массу тела у них измеряли через 0, 1 и 2 недели после обработки. На фиг. 10B C57BL/6 мыши получали дозы 100 мкг ASO-005459, и массы тела животных измеряли один раз в неделю в течение 28 суток. На обеих из фиг. 10A и 10B животных, получавших контроль со средой, использовали в качестве контролей. Показанные данные представляют собой среднее значение  $\pm$ SD от нескольких животных ( $n=5$ ). Показанные статистические данные основываются на двухфакторном дисперсионном анализе.

На фиг. 11A, 11B и 11C показаны уровни экспрессии мРНК SNCA в гиппокампе (фиг. 11A), стволе головного мозга (фиг. 11B) и полосатом теле (фиг. 11C) у A53T-PAC мышей через 14 суток после ICV введения ASO-005459 (3,13 мкг, 12,5 мкг, 25 мкг или 50 мкг) или контроля со средой. Уровни мРНК SNCA измеряли с помощью qRT-PCR, нормализовали к мРНК GAPDH, а затем выражали относительно среднего значения в группе со средой. Показанные данные представляют собой среднее значение  $\pm$ SD от нескольких животных ( $n=5$ ). Каждый круг представляет отдельное животное. Горизонтальные линии обозначают эталонное значение, составляющее 1 (т.е. значение, при котором экспрессия мРНК SNCA будет эквивалентной уровню экспрессии, наблюдаемому в контрольной группе со средой). Показанные статистические данные основываются на однофакторном дисперсионном анализе с апостериорным критерием Даннета. \*\*\*  $p < 0,001$ .

На фиг. 12 показан уровень ASO-005459, выявленного в гиппокампе (черный), стволе головного мозга (светло-серый) и полосатом теле (темно-серый) A53T-PAC мышей через 14 суток после обработки ASO-005459. Мыши получали 3,13 мкг, 12,5 мкг, 25 мкг или 50 мкг ASO-005459 посредством ICV введения. Показанные данные представляют собой среднее значение  $\pm$ SD от нескольких животных ( $n=5$ ).

На фиг. 13A, 13B, 13C и 13D показана взаимосвязь между уровнями воздействия ASO-005459 и экспрессией мРНК SNCA в гиппокампе (фиг. 13A), стволе головного мозга (фиг. 13B) и полосатом теле (фиг. 13C) у A53T-РАС мышей через четырнадцать суток после обработки ASO-005459. На фиг. 13D показаны данные от гиппокампа (круг), ствола головного мозга (квадрат) и полосатого тела (треугольник) в комбинации. Каждая точка данных на графике представляет собой отдельное животное. Четырехпараметрическая нелинейная аппроксимация показана для гиппокампа (фиг. 13A) и ствола головного мозга (фиг. 13B).

На фиг. 14A и 14B показаны кривые доза-ответ для воздействия ASO-005459 на уровень экспрессии мРНК SNCA у A53T-РАС мышей. Животные получали (посредством ICV инъекции) 12,5 мкг (круг), 25 мкг (квадрат) или 50 мкг (треугольник) ASO-005459, и их умерщвляли через 24 ч, 3 суток, 4, 8, 12, 16 и 20 недель после получения доз. Уровни экспрессии мРНК SNCA как в стволе головного мозга (фиг. 14A), так и в полосатое тело (фиг. 14B) оценивали посредством qRT-PCR, а затем нормализовали к контролю со средой. Показано среднее значение для данных. Горизонтальной линией обозначено эталонное значение 100% (т.е. значение, при котором экспрессия мРНК SNCA будет эквивалентной уровню экспрессии, наблюдаемому в контрольной группе со средой).

На фиг. 15A и 15B показано воздействие ASO-005459 на уровень экспрессии мРНК SNCA у A53T-РАС мышей через 4 недели после введения ASO-005459. Животные получали либо контроль со средой, либо переменные концентрации ASO-005459 (12,5, 25 или 50 мкг). Относительный уровень экспрессии мРНК SNCA (нормализованный к контролю со средой) показан как для ствола головного мозга (фиг. 15A), так и полосатое тело (фиг. 15B). Каждая точка данных на графике представляет собой отдельное животное. Также показано среднее значение  $\pm$ SD от нескольких животных. Показанные статистические данные основываются на сравнении с группой со средой с применением однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннета для множественных сравнений. Горизонтальные линии обозначают эталонное значение, составляющее 1 (т.е. значение, при котором экспрессия мРНК SNCA будет эквивалентной уровню экспрессии, наблюдаемому в контрольной группе со средой). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

На фиг. 16A и 16B показаны кривые доза-ответ для воздействия ASO-005459 на уровень экспрессии белка SNCA в тканях головного мозга у A53T-РАС мышей. Животные получали (посредством ICV инъекции) 12,5 мкг (круг), 25 мкг (квадрат) или 50 мкг (треугольник) ASO-005459, и их умерщвляли через 24 ч, 3 суток, 4, 8, 12, 16 и 20 недель после получения доз. Уровни белка SNCA измеряли как в стволе головного мозга (фиг. 16A), так и в полосатом теле (фиг. 16B) посредством ELISA, а затем нормализовали к контролю со средой. Показано среднее значение для данных. Горизонтальной линией обозначено эталонное значение 100% (т.е. значение, при котором экспрессия мРНК SNCA будет эквивалентной уровню экспрессии, наблюдаемому в контрольной группе со средой).

На фиг. 17A и 17B показано воздействие ASO-005459 на уровень экспрессии белка SNCA у A53T-РАС мышей через 8 недель после введения ASO-005459. Животные получали либо контроль со средой, либо переменные концентрации ASO-005459 (12,5, 25 или 50 мкг). Относительные уровни экспрессии белка SNCA (нормализованный к контролю со средой) показаны как для ствола головного мозга (фиг. 17A), так и полосатое тело (фиг. 17B). Каждая точка данных на графике представляет собой отдельное животное. Горизонтальной линией обозначено эталонное значение 100% (т.е. значение, при котором экспрессия мРНК SNCA будет эквивалентной уровню экспрессии, наблюдаемому в контрольной группе со средой). Также показано среднее значение  $\pm$ SD от нескольких животных. Показанные статистические данные основываются на сравнении с группой со средой с применением однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннета для множественных сравнений.

На фиг. 18A и 18B показано воздействие ASO-005578 и ASO-005584 на уровень экспрессии мРНК SNCA в тканях головного мозга яванских макаков. На фиг. 18A животные получали одно из следующего: контроль с носителем (круг), ASO-005578 (квадрат, 4 мг) или ASO-005584 (треугольник, 4 мг). Затем, животных умерщвляли через 2 недели после введения доз. На фиг. 18B животные получали либо контроль со средой, либо ASO-005584 (8 мг на животное), а затем умерщвляли через 2 недели (квадрат) и через 4 недели после введения доз (треугольник). На обеих из фиг. 18A и 18B оценивали уровень экспрессии мРНК SNCA в следующих тканях: продолговатый мозг (верхняя левая секция), дорсальный отдел полосатого тела (caudate putamen) (верхняя средняя секция), варолиев мост (верхняя правая секция), мозжечок (верхняя левая секция), поясничный отдел спинного мозга (нижняя средняя секция) и лобная доля коры головного мозга (нижняя правая секция). Уровни экспрессии мРНК SNCA, показанные на фиг. 18A и 18B, нормализовали к GAPDH, и тогда они представлены относительно среднего значения для контрольной группы ("среда"). Показаны как данные для отдельных животных, так и среднее значение. Горизонтальной линией обозначено эталонное значение 100% (т.е. значение, при котором экспрессия мРНК SNCA будет эквивалентной уровню экспрессии, наблюдаемому в контрольной группе со средой).

На фиг. 19A и 19B показана динамика уровней экспрессии мРНК SNCA и белка SNCA у яванских макаков после введения ASO-005459. Каждое из животных получало либо контроль со средой, либо ASO-005459 (8 мг), а затем их умерщвляли через 24 ч, 3 суток, 2, 4, 8, 13 или 20 недель после введения

доз. В каждый момент времени уровни экспрессии мРНК SNCA (фиг. 19А) и белка SNCA (фиг. 19В) оценивали в следующих тканях: продолговатый мозг (верхняя левая секция), дорсальный отдел полосатого тела (верхняя средняя секция), варолиев мост (верхняя правая секция), мозжечок (верхняя левая секция), поясничный отдел спинного мозга (нижняя средняя секция) и лобная доля коры головного мозга (нижняя правая секция). Уровни экспрессии представлены в виде процента относительно контроля со средой. Показаны как данные для отдельных животных, так и среднее значение. Горизонтальной линией обозначено эталонное значение 100% (т.е. значение, при котором экспрессия мРНК SNCA будет эквивалентной уровню экспрессии, наблюдаемому в контрольной группе со средой).

На фиг. 20А и 20В показан относительный уровень экспрессии (в виде процента относительно контроля со средой) как мРНК SNCA (фиг. 20А), так и белка SNCA (фиг. 20В) у яванских макаков через 2 недели после введения ASO-005459. Животные получали либо контроль со средой, либо переменные концентрации ASO-005459 (2, 4 или 8 мг). Уровни экспрессии оценивали в следующих тканях: продолговатый мозг (верхняя левая секция), дорсальный отдел полосатого тела (верхняя средняя секция), варолиев мост (верхняя правая секция), мозжечок (верхняя левая секция), поясничный отдел спинного мозга (нижняя средняя секция) и лобная доля коры головного мозга (нижняя правая секция). Уровни экспрессии представлены в виде процента относительно контроля со средой. Показаны как данные для отдельных животных, так и среднее значение. Горизонтальной линией обозначено эталонное значение 100% (т.е. значение, при котором экспрессия мРНК SNCA будет эквивалентной уровню экспрессии, наблюдаемому в контрольной группе со средой).

На фиг. 21А показана непрерывная нуклеотидная последовательность ASO-005459. ОхуА, ОхуТ и ОхуМС представляют собой аденин-бета-D-окси-LNA, тимин-бета-D-окси-LNA и метилцитозин-бета-D-окси-LNA, соответственно; DNAt, DNAc и DNAa представляют собой ДНК, цитозинговую ДНК и адениновую ДНК, соответственно; и s представляет собой фосфоротиоатный мостик.

На фиг. 21В показана молекулярная структура ASO-005459, который раскрыт в данном документе. Представленная структура имеет молекулярную формулу  $C_{171}H_{214}N_{56}O_{90}P_{16}S_{16}$ , и каждый из  $M^+$  представляет собой фармацевтически приемлемый противоион, такой как  $H^+$ ,  $Na^+$  или  $NH_4^+$ .

#### Подробное раскрытие настоящего изобретения

##### I. Определения.

Следует отметить, что термин в единственном числе относятся к одной или нескольким единицам данного термина; например, следует понимать, что термин "нуклеотидная последовательность" представляет одну или несколько нуклеотидных последовательностей. В связи с этим, термины "один" (или "некий"), "один или несколько" и "по меньшей мере один" можно использовать в данном документе взаимозаменяемо. Более того, в случае, когда в данном документе используют "и/или", его следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух определенных признаков или компонентов с другим признаком или компонентом или без него. Таким образом, предполагается, что в данном документе термин "и/или" при использовании во фразе, такой как "А и/или В", включает в себя "А и В", "А или В", "А" (отдельно) и "В" (отдельно). Аналогично, предполагается, что термин "и/или" при использовании во фразе, такой как "А, В и/или С", охватывает каждый из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно). Следует понимать, что во всех случаях, когда аспекты описаны в данном документе с выражением "содержащий", также предполагаются иные аналогичные аспекты, описанные терминами "состоящий из" и/или "состоящий, по существу, из".

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое понятно квалифицированному специалисту в области техники, к которой относится настоящее раскрытие. Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2<sup>nd</sup> ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3<sup>rd</sup> ed., 1999, Academic Press; и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, обеспечивают для специалиста в данной области техники общий словарь многих из терминов, используемых в данном раскрытии.

Единицы, префиксы и символы представлены в форме, принятой в Международной системе единиц (SI). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, нуклеотидные последовательности записаны слева направо в 5'-3' ориентации. Аминокислотные последовательности записаны слева направо в ориентации от амино- к карбокси-концу. Заголовки разделов, представленные в данном документе, не являются ограничениями различных аспектов настоящего раскрытия, которые они могли иметь применительно к данному описанию в целом. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, являются более полно определенными со ссылкой на данное описание в его полноте.

Термин "приблизительно", используемый в контексте данного документа, означает примерно, округленно, около или в районе. Когда термин "приблизительно" используют в сочетании с числовым диапазоном, он модифицирует этот диапазон, расширяя его границы выше и ниже изложенных числовых значений. Обычно термин "приблизительно" может модифицировать числовое значение выше и ниже изложенного значения посредством отклонения, например, на 10 процентов, вверх или вниз (выше или

ниже). Например, если изложено, что "ASO снижает экспрессию белка к SNCA в клетке после введения ASO по меньшей мере приблизительно на 60%", подразумевают, что уровни SNCA снижаются на значение в диапазоне от 50% до 70%.

Термин "антисмысловый олигонуклеотид" (ASO) относится к олигомеру или полимеру из нуклеозидов, таких как встречающиеся в естественных условиях нуклеозиды или их модифицированные формы, которые ковалентно связаны друг с другом посредством межнуклеозидных мостиков. ASO, пригодные для настоящего раскрытия, включают в себя по меньшей мере один не встречающийся в естественных условиях нуклеозид. ASO является комплементарным нуклеиновой кислоте-мишени, благодаря чему ASO гибридизируется с последовательностью нуклеиновой кислоты-мишени. Термины "антисмысловый ASO", "ASO" и "олигомер", используемые в контексте данного документа, являются взаимозаменяемыми с термином "ASO".

Предполагается, что термины "нуклеиновые кислоты" или "нуклеотиды" включают множество нуклеиновых кислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления термины "нуклеиновые кислоты" или "нуклеотиды" относятся к последовательности-мишени, например, пре-мРНК, мРНК или ДНК *in vivo* или *in vitro*. Когда термин относится к нуклеиновым кислотам или нуклеотидам в последовательности-мишени, нуклеиновые кислоты или нуклеотиды могут представлять собой встречающиеся в естественных условиях последовательности в пределах клетки. В соответствии с другими вариантами осуществления "нуклеиновые кислоты" или "нуклеотиды" относятся к последовательности в ASO согласно настоящему раскрытию. Когда термин относится к последовательности в ASO, нуклеиновые кислоты или нуклеотиды являются не встречающимися в естественных условиях, т.е. химически синтезированными, полученными в результате ферментативных реакций, полученными с помощью технологии рекомбинантной ДНК или любой их комбинации. В соответствии с одним вариантом осуществления нуклеиновые кислоты или нуклеотиды в ASO получены с помощью синтеза или с помощью технологии рекомбинантной ДНК, а не представляют собой встречающуюся в естественных условиях последовательность или ее фрагмент. В соответствии с еще одним вариантом осуществления нуклеиновые кислоты или нуклеотиды в ASO не являются встречающимися в естественных условиях, поскольку они содержат по меньшей мере один нуклеотидный аналог, который не встречается в естественных условиях. Термины "нуклеиновая кислота" или "нуклеозид" относятся к одному сегменту нуклеиновой кислоты, например, ДНК, РНК или их аналогу, присутствующему в полинуклеотиде. "Нуклеиновая кислота" или "нуклеозид" включают в себя встречающиеся в естественных условиях нуклеиновые кислоты или не встречающиеся в естественных условиях нуклеиновые кислоты. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления термины "нуклеотид", "звено" и "мономер" используются взаимозаменяемо. Будет понятно, что применительно к последовательности нуклеотидов или мономеров, которую называют последовательностью оснований, таких как А, Т, G, С или U, и их аналогов. Термин "нуклеотид", используемый в контексте данного документа, относится к гликозиду, содержащему сахарный фрагмент, фрагмент основания и ковалентно связанную группу (мостиковую группу), такую как фосфатные или фосфоротиоатные межнуклеотидные мостиковые группы, и охватывает как встречающиеся в естественных условиях нуклеотиды, такие как ДНК или РНК, и не встречающиеся в естественных условиях нуклеотиды, содержащие модифицированный сахар и/или основание, которые также называют в данном документе "нуклеотидными аналогами". В данном документе один нуклеотид (звено) также можно назвать мономером или звеном нуклеиновой кислоты. В соответствии с определенными вариантами осуществления термин "нуклеотидные аналоги" относится к нуклеотидам, имеющим модифицированные сахарные фрагменты. Неограничивающие примеры нуклеотидов, имеющих модифицированные сахарные фрагменты (например, LNA), раскрыты в других местах в данном документе. В соответствии с другими вариантами осуществления термин "нуклеотидные аналоги" относится к нуклеотидам, имеющим модифицированные фрагменты нуклеотидных оснований. Нуклеотиды, имеющие модифицированные фрагменты нуклеотидных оснований, включают в себя, без ограничения, 5-метилцитозин, изоцитозин, псевдоизоцитозин, 5-бромурацил, 5-пропилурацил, 6-аминопурин, 2-аминопурин, инозин, диаминопурин и 2-хлор-6-аминопурин.

Термин "нуклеозид", используемый в контексте данного документа, относится к гликозиду, содержащему сахарный фрагмент и фрагмент основания, который может быть ковалентно связан посредством межнуклеотидных мостиков между нуклеозидами в ASO. В области биотехнологии термин "нуклеозид" часто относится к мономеру или звену нуклеиновой кислоты. В контексте ASO термин "нуклеозид" может относиться только к основанию, т.е. последовательности нуклеотидных оснований, содержащей цитозин (ДНК и РНК), гуанин (ДНК и РНК), аденин (ДНК и РНК), тимин (ДНК) и урацил (РНК), в которой подразумевается присутствие сахарного остова и межнуклеотидных мостиков. Аналогично, в частности, в случае олигонуклеотидов, в которых одна или несколько из межнуклеотидных мостиковых групп являются модифицированными, термин "нуклеотид" может относиться к "нуклеозиду". Например, термин "нуклеотид" можно использовать даже при определении наличия или природы мостиков между нуклеозидами.

Термин "длина в нуклеотидах", используемый в контексте данного документа, означает общее число нуклеотидов (мономеров) в заданной последовательности. Например, последовательность AtTcscTTtaccACAC (SEQ ID NO: 15) имеет 17 нуклеотидов; следовательно, длина последовательности в нуклео-

тидах составляет 17. Таким образом, термин "длина в нуклеотидах" используется в данном документе взаимозаменяемо с "числом нуклеотидов".

Как будет понятно квалифицированному специалисту в данной области техники, 5' концевой нуклеотид в олигонуклеотиде не содержит 5' межнуклеотидную мостиковую группу, хотя он может содержать 5' концевую концевую группу.

В контексте данного документа "кодирующий участок" или "кодирующая последовательность" представляет собой часть полинуклеотид, который состоит из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Несмотря на то что "стоп-кодон" (TAG, TGA или TAA), как правило, не транслируется в аминокислоту, его можно рассматривать как часть кодирующего участка, но любые фланкирующие последовательности, например, промоторы, сайты связывания рибосом, терминаторы транскрипции, интроны, нетранслируемые участки ("UTR") и т.п., не являются частью кодирующего участка. Границы кодирующего участка, как правило, определяются старт-кодоном на 5'-конце, кодирующим аминоконец образующегося в результате полипептида, и трансляционным стоп-кодоном на 3'-конце, кодирующим карбоксильный конец образующегося в результате полипептида.

Термин "некодирующий участок", используемый в контексте данного документа, означает нуклеотидную последовательность, которая не представляет собой кодирующий участок. Примеры некодирующих участков включают в себя, без ограничения, промоторы, сайты связывания рибосом, терминаторы транскрипции, интроны, нетранслируемые участки ("UTR"), некодирующие экзоны и т.п. Некоторые из экзонов могут целиком представлять собой 5' нетранслируемый участок (5' UTR) или 3' нетранслируемый участок (3' UTR) каждого транскрипта или являются их частью. Нетранслируемые участки являются важными для эффективной трансляции транскрипта и для контроля скорости трансляции и периода полужизни транскрипта.

Термин "участок" при использовании в контексте нуклеотидной последовательности относится к части этой последовательности. Например, фраза "участок в нуклеотидной последовательности" или "участок в комплементарной цепи нуклеотидной последовательности" относится к последовательности, которая короче, чем нуклеотидная последовательность, но длиннее, чем по меньшей мере 10 нуклеотидов, расположенных в пределах конкретной нуклеотидной последовательности или комплементарной цепи нуклеотидной последовательности, соответственно. Термины "субпоследовательность" или "подпоследовательность" также могут относиться к участку в нуклеотидной последовательности.

Термин "ниже" применительно к нуклеотидной последовательности означает, что нуклеиновая кислота или нуклеотидная последовательность расположена со стороны 3' конца относительно упоминаемой нуклеотидной последовательности. В соответствии с определенными вариантами осуществления нижележащие нуклеотидные последовательности относятся к последовательностям, которые расположены после точки начала транскрипции. Например, иницирующий трансляцию кодон гена расположен ниже сайта старта транскрипции.

Термин "выше" относится к нуклеотидной последовательности, которая расположена со стороны 5' конца относительно упоминаемой нуклеотидной последовательности. Если не указано иное, последовательности, представленные в данном документе, изложены от 5'-конца (слева) к 3'-концу (направо).

В контексте данного документа термин "регуляторный участок" относится к нуклеотидным последовательностям, которые расположены выше (5' некодирующие последовательности), в пределах или ниже (3' некодирующие последовательности) кодирующего участка, и которые оказывают влияние на транскрипцию, процессинг, стабильность или трансляцию РНК ассоциированного кодирующего участка. Регуляторные участки могут включать в себя промоторы, трансляционные лидерные последовательности, интроны, распознаваемые последовательности для полиаденилирования, сайты процессинга РНК, сайты связывания эффекторных молекул, UTR и структуры типа "стебель-петля". Если кодирующий участок предназначен для экспрессии в эукариотической клетке, сигнал полиаденилирования и последовательность терминации транскрипции обычно будут располагаться со стороны 3'-конца относительно кодирующей последовательности. Термин "транскрипт", используемый в контексте данного документа, может относиться к первичному транскрипту, который синтезируется при транскрипции ДНК и становится матричной РНК (мРНК) после процессинга, т. е. предшественник матричной РНК (пре-мРНК), и к самой подвергнутой процессингу мРНК. Термин "транскрипт" можно использовать взаимозаменяемо с "пре-мРНК" и "мРНК". После того как цепи ДНК транскрибируются в первичные транскрипты, заново синтезированные первичные транскрипты модифицируются несколькими способами, благодаря чему они превращаются в свои зрелые функциональные формы, такие как мРНК, тРНК, рРНК, lncRNA, miRNA и другие. Таким образом, термин "транскрипт" может включать в себя экзоны, интроны, 5' UTR и 3' UTR.

Термин "экспрессия", используемый в контексте данного документа, относится к процессу, посредством которого полинуклеотид продуцирует продукт гена, например, РНК или полипептид. Он включает в себя, без ограничения, транскрипцию полинуклеотида в матричную РНК (мРНК) и трансляцию мРНК в полипептид. Экспрессия продуцирует "генный продукт". В контексте данного документа, продукт гена может представлять собой либо нуклеиновую кислоту, например, матричную РНК, продуцируемую при транскрипции гена, либо полипептид, который транслируется с транскрипта. Продукты гена, опи-

санные в данном документе, дополнительно включают в себя нуклеиновые кислоты с посттранскрипционными модификациями, например, полиаденилированием или сплайсингом, или полипептиды с посттрансляционными модификациями, например, метилированием, гликозилированием, присоединением липидов, ассоциацией с другими белковыми субъединицами или протеолитическим расщеплением.

Термины "идентичный" или процентная "идентичность" в контексте двух или более нуклеиновых кислот относятся к двум или более последовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми, когда их сравнивают и выравнивают (с введением гэпов, если это необходимо) для максимального соответствия, не учитывая любые консервативные аминокислотные замены в рамках идентичности последовательности. Процентную идентичность можно измерить с применением программного обеспечения или алгоритмов для сравнения последовательностей или посредством визуальной проверки. В уровне техники известны различные алгоритмы и программное обеспечение, которые можно применять для получения выравниваний аминокислотных или нуклеотидных последовательностей. Один такой неограничивающий пример выравнивания последовательности представляет собой алгоритм, описанный в Karlin et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:2264-2268, который модифицирован в Karlin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., 90:5873-5877, и включен в программы NBLAST и XBLAST (Altschul et al., 1991, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402). В соответствии с определенными вариантами осуществления Gapped BLAST можно применять, как описано в Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology, 266:460-480), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, Южный Сан-Франциско, Калифорния, США) или Megalign (DNASTAR) представляют собой дополнительные общедоступные компьютерные программы, которые можно применять для выравнивания последовательностей. В соответствии с определенными вариантами осуществления процентную идентичность между двумя нуклеотидными последовательностями определяют с применением программы GAP в пакете программного обеспечения GCG (например, с применением матрицы NWSgapdna.CMP и штрафа за открытие гэпа 40, 50, 60, 70 или 90 и штрафа за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6). В соответствии с определенными альтернативными вариантами осуществления программа GAP в пакете программного обеспечения GCG, в который встроен алгоритм из Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)), можно применять для определения процентной идентичности между двумя аминокислотными последовательностями (например, с применением либо матрицы BLOSUM 62, либо матрицы PAM250 и штрафа за открытие гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штрафа за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5). В качестве альтернативы, в соответствии с определенными вариантами осуществления процентную идентичность между нуклеотидными или аминокислотными последовательностями определяют с применением алгоритма из Myers and Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)). Например, процентную идентичность можно определить с применением программы ALIGN (версии 2.0) и с применением таблицы остатков PAM120, штрафа за продолжение гэпа 12 и штрафа за открытие гэпа 4. Специалист в данной области техники может определить подходящие параметры для максимального выравнивания с помощью конкретного программного обеспечения для выравнивания. В соответствии с определенными вариантами осуществления применяют параметры по умолчанию в программном обеспечении для выравнивания.

В соответствии с определенными вариантами осуществления процентную идентичность "X" первой нуклеотидной последовательности с второй нуклеотидной последовательностью рассчитывают следующим образом  $100 \times (Y/Z)$ , где Y представляет собой число аминокислотных остатков, оцененных как идентичные совпадения при выравнивании первой и второй последовательностей (которые выровнены посредством визуальной проверки или с помощью конкретной программы для выравнивания последовательностей), и Z представляет собой общее количество остатков во второй последовательности. Если длина первой последовательности больше, чем второй последовательности, процентная идентичность первой последовательности со второй последовательностью будет выше, чем процентная идентичность второй последовательности с первой последовательностью. Каждый из отличающихся участков в пределах одной целевой последовательности полинуклеотида, которые выравнивают с эталонной последовательностью полинуклеотида, может иметь свою собственную процентную идентичность последовательности. Стоит отметить, что значение процентной идентичности последовательности округляют к ближайшей десятой части. Например, 80,11, 80,12, 80,13 и 80,14 округляют в меньшую сторону до 80,1, в то время как 80,15, 80,16, 80,17, 80,18 и 80,19 округляют до 80,2. Также следует отметить, что значение длины всегда будет представлять собой целое число. В контексте данного документа термины "гомологичный" и "гомология" являются взаимозаменяемыми с терминами "идентичность" и "идентичный".

Термин "его встречающийся в естественных условиях вариант" относится к вариантам полипептидной последовательности SNCA или последовательности нуклеиновой кислоты SNCA (например, транскрипта), которые существуют в естественных условиях в рамках определенной таксономической группы, такой как млекопитающие, как например, у мыши, обезьяны и человека. Как правило, применительно к "встречающимся в естественных условиях вариантам" полинуклеотида термин также включает любой аллельный вариант кодирующей SNCA геномной ДНК, который находится в хромосомном положении 17q21 при хромосомной транслокации или дупликации, и РНК, такую как мРНК, полученную из него. "Встречающиеся в естественных условиях варианты" также могут включать в себя варианты, получен-

ные в результате альтернативного сплайсинга мРНК SNCA. Применительно к конкретной полипептидной последовательности, например, термин также включает в себя встречающиеся в естественных условиях формы белка, которые, следовательно, могут подвергаться процессингу, например, посредством котрансляционных или посттрансляционных модификаций, таких как отщепление, протеолитическое расщепление, гликозилирование и т.д. При определении степени "комплементарности" между ASO согласно настоящему раскрытию (или их участками) и участком-мишенью нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок SNCA млекопитающего (например, ген SNCA), такой как раскрытые в данном документе, степень "комплементарности" (также "гомологии" или "идентичности") выражена в виде процентной идентичности (или процентной гомологии) между последовательностью ASO (или его участка) и последовательностью участка-мишени (или обратной комплементарной последовательностью участка-мишени), которая наилучшим образом выравнивается с ней. Процент рассчитывают посредством подсчета количества выровненных оснований, которые являются идентичными в двух последовательностях, деления на общее количество смежных мономеров в ASO и умножения на 100. При таком сравнении, если существуют гэпы, предпочтительно, чтобы такие гэпы являлись лишь несовпадениями, а не участками, в которых количество мономеров в пределах гэпа отличается у ASO согласно настоящему раскрытию и участка-мишени.

Термин "комплементарная последовательность", используемый в контексте данного документа, означает последовательность, которая является комплементарной эталонной последовательности. Хорошо известно, что комплементарность является базовым принципом репликации и транскрипции ДНК, поскольку она является свойством, общим для двух последовательностей ДНК или РНК, благодаря которому при их выравнивании антипараллельно друг другу нуклеотидные основания в каждом положении в последовательностях будут комплементарными, что напоминает отражение, увиденное при взгляде в зеркало. Таким образом, например, комплементарная последовательность для а последовательности 5'"ATGC"3' может быть записана как 3'"TACG"5' или 5'"GCAT"3'. Термины "обратная комплементарная последовательность", "обратно комплементарный" и "обратная комплементарность", используемые в контексте данного документа, являются взаимозаменяемыми с терминами "комплементарная последовательность", "комплементарный" и "комплементарность".

Термины "соответствующий" и "соответствует" применительно к двум отдельным последовательностям нуклеиновой кислоты или нуклеотидным последовательностям можно использовать для уточнения участков в последовательностях, которые соответствуют или являются подобными друг другу, исходя из гомологии и/или функциональных свойств, хотя нуклеотиды в конкретных последовательностях могут быть пронумерованы по-разному. Например, разные изоформы транскрипта гена могут иметь подобные или консервативные части нуклеотидных последовательностей, нумерация которых может отличаться у соответствующих изоформ вследствие альтернативного сплайсинга и/или других модификаций. Кроме того, предполагается, что при характеристике нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательности (например, транскрипта гена) можно использовать разные системы нумерации и либо начинать нумерацию последовательности с трансляционного старт-кодона, либо включать 5'UTR. Кроме того, предполагают, что нуклеиновая кислота или нуклеотидная последовательность разных вариантов гена или транскрипта гена может изменяться. Тем не менее, в контексте данного документа участки в вариантах, которые имеют гомологию последовательности нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательности и/или имеют общие функциональные свойства, считают "соответствующими" друг другу. Например, нуклеотидная последовательность транскрипта SNCA, соответствующая нуклеотидам с X по Y в SEQ ID NO: 1 ("эталонная последовательность"), относится к последовательности транскрипта SNCA (например, пре-мРНК или мРНК SNCA), которая имеет идентичную последовательность или подобную последовательность нуклеотидам с X по Y в SEQ ID NO: 1. Квалифицированный специалист в данной области техники сможет идентифицировать соответствующие остатки X и Y в последовательности транскрипта SNCA посредством выравнивания последовательности транскрипта SNCA с SEQ ID NO: 1. Предполагается, что термины "соответствующий нуклеотидный аналог" и "соответствующий нуклеотид" указывают на то, что нуклеотидное основание в нуклеотидном аналоге и встречающемся в естественных условиях нуклеотиде характеризуется одинаковой способностью к спариванию или гибридизации. Например, когда 2-дезоксирибозная единица нуклеотида связана с аденином, "соответствующий нуклеотидный аналог" содержит пентозную единицу (отличную от 2-дезоксирибозы), связанную с аденином. Термин "номер DES" или "DES No.", используемый в контексте данного документа, относится к индивидуальному номеру, присвоенному нуклеотидной последовательности, имеющей конкретный паттерн нуклеозидов (например, ДНК) и нуклеозидных аналогов (например, LNA). В контексте данного документа схема ASO показана посредством комбинации заглавных букв и строчных букв. Например, DES-005459 относится к последовательности ASO AtTcctttacaccACAC (SEQ ID NO: 15) со схемой ASO LDLDDDDDDDDDDLLLLL (т.е. AtTcctttacaccACAC), причем L (т.е. заглавная буква) обозначает нуклеозидный аналог (например, LNA), и D (т.е. строчная буква) обозначает нуклеозид (например, ДНК).

Термин "номер ASO" или "ASO No.", используемый в контексте данного документа, относится к индивидуальному номеру, присвоенному нуклеотидной последовательности, имеющей детальную химическую структуру составляющих, например, нуклеозидов (например, ДНК), нуклеозидных аналогов (на-

пример, бета-D-окси-LNA), нуклеотидных оснований (например, A, T, G, C, U или MC), и структуру остова (например, фосфоротиоатный или фосфодиэфирный). Например, ASO-005459 относится к OxyAs DNAts OxyTs DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC.

"Активность" обычно выражена в виде значения IC<sub>50</sub> или EC<sub>50</sub> в мкМ, нМ или пМ, если не указано иное. Активность также можно выразить в виде ингибирования в процентах. IC<sub>50</sub> представляет собой медианную ингибирующую концентрацию терапевтической молекулы. EC<sub>50</sub> представляет собой медианную эффективную концентрацию терапевтической молекулы по сравнению со средой или контролем (например, солевым раствором). В функциональных анализах IC<sub>50</sub> представляет собой концентрацию терапевтической молекулы, которая снижает биологический ответ, например, транскрипцию мРНК или экспрессию белка, на 50% от биологического ответа, которого достигают с помощью терапевтической молекулы. В функциональных анализах EC<sub>50</sub> представляет собой концентрацию терапевтической молекулы, которая генерирует 50% биологического ответа, например, транскрипцию мРНК или экспрессию белка. IC<sub>50</sub> или EC<sub>50</sub> можно рассчитывать с помощью любого количества средств, известных в уровне техники.

Под "субъектом", или "индивидом", или "животным", или "пациентом", или "млекопитающим" подразумевают любого субъекта, в частности, субъекта-млекопитающее, для которого является желательным диагностика, прогноз или терапия. Субъекты-млекопитающие включают в себя людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных, животных, используемых в спорте, и животных из зоопарка, в том числе, например, людей, отличных от человека приматов, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупный рогатый скот, медведей и прочих.

Термин "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который присутствует в такой форме, которая позволяет биологической активности активного ингредиента быть эффективным, и который не содержит дополнительных компонентов, которые имеют неприемлемую токсичность для субъекта, которому будут вводить композицию. Такая композиция может быть стерильной.

"Эффективное количество" ASO, который раскрыт в данном документе, представляет собой количество, достаточное для того, чтобы достичь конкретной поставленной цели. "Эффективное количество" можно определить эмпирически и обычным образом в зависимости от поставленной цели.

Такие термины, как "осуществление лечения", или "лечение", или "лечить", или "облегчение", или "облегчать", относятся как к (1) терапевтическим мерам, которые излечивают, замедляют, уменьшают симптомы и/или останавливают развитие диагностированного патологического состояния или нарушения, так и к (2) профилактическим или превентивным мерам, которые предупреждают и/или замедляют развитие интересующего патологического состояния или нарушения. Таким образом, субъекты, нуждающиеся в лечении, включают в себя субъектов, которые уже имеют нарушение; субъектов, предрасположенных к нарушению; и субъектов, у которых нужно предупредить нарушение. В соответствии с определенными вариантами осуществления субъект успешно "получает лечение" от заболевания или состояния, раскрытого в других местах в данном документе, в соответствии со способами, представленными в данном документе, если пациент демонстрирует, например, полное, частичное или временное облегчение или устранение симптомов, ассоциированных с заболеванием или нарушением.

## II. Антисмысловые олигонуклеотиды.

Настоящее раскрытие использует антисмысловые олигонуклеотиды для применения в модулировании функции молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих  $\alpha$ -Syn млекопитающего, таких как нуклеиновая кислота SNCA, например, транскрипт SNCA, в том числе пре-мРНК SNCA и мРНК SNCA или встречающиеся в естественных условиях варианты таких молекул нуклеиновой кислоты, кодирующие  $\alpha$ -Syn млекопитающего. Термин "ASO" в контексте настоящего раскрытия относится к молекуле, образованной посредством ковалентной связи двух или более нуклеотидов (т.е. к олигонуклеотиду).

ASO содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной от приблизительно 10 до приблизительно 30 нуклеотидов, как например, 10-20, 16-20 или 15-25 нуклеотидов. Термины "антисмысловой ASO", "антисмысловой олигонуклеотид" и "олигомер", используемые в контексте данного документа, являются взаимозаменяемыми с термином "ASO".

Ссылка на номер SEQ ID включает в себя конкретную последовательность нуклеотидных оснований, но не включает в себя любую схему или полную химическую структуру, показанную на фиг. 2 или 3. Более того, ASO, раскрытые на фигурах в данном документе, демонстрируют типичную схему, но не являются ограниченными конкретной схемой, показанной на фигурах, если не указано иное. В данном документе один нуклеотид (звено) также можно назвать мономером или звеном. Когда данное описание относится к конкретному номеру ASO, ссылка включает в себя последовательность, конкретную схему ASO и химическую структуру. Когда данное описание относится к конкретному номеру DES, ссылка включает в себя последовательность и конкретную схему ASO. Например, когда пункт формулы изобретения (или данное описание) относится к SEQ ID NO: 15, она включает в себя только нуклеотидную последовательность attcctttacassacac. Когда пункт формулы изобретения (или данное описание) относится к DES-005459, она включает в себя нуклеотидную последовательность attcctttacassacac со схемой ASO,

представленной на фигуре (т.е. AtTcctttacaccACAC). В качестве альтернативы, схема ASO-005459 может быть записана как SEQ ID NO: 15, в которой каждый из первого нуклеотида, третьего нуклеотида и 14<sup>го</sup>-17<sup>го</sup> нуклеотидов с 5'-конца представляет собой модифицированный нуклеотид, например, LNA, и каждый из других нуклеотидов представляет собой немодифицированный нуклеотид (например, ДНК). Номер ASO включает в себя последовательность и схему ASO, а также конкретные детали ASO. Таким образом, ASO-005459, упоминаемый в данной заявке, означает OxyAs DNAts OxyTs DNACs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs DNACs DNACs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC, причем "s" обозначает фосфоротиоатный мостик. В соответствии с различными вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию не содержат РНК (звенья). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO содержит одно или несколько звеньев ДНК. В соответствии с одним вариантом осуществления ASO согласно настоящему раскрытию представляет собой линейную молекулу или синтезирован в виде линейной молекулы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO представляет собой одноцепочечную молекулу и не содержит короткие участки, например, по меньшей мере из 3, 4 или 5 смежных нуклеотидов, которые являются комплементарными эквивалентными участкам в пределах того же ASO (т.е. дуплексы), в связи с этим, ASO не являются (по существу) двухцепочечными. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO, по существу, не является двухцепочечным. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO не представляет собой siRNA. В соответствии с различными вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию может полностью состоять из непрерывного нуклеотидного участка. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO не является практически самокомплементарным.

В соответствии с одним вариантом осуществления ASO согласно настоящему раскрытию могут иметь форму любых фармацевтически приемлемых солей. Термин "фармацевтически приемлемые соли", используемый в контексте данного документа, относится к производным ASO согласно настоящему раскрытию, причем ASO является модифицированным (например, посредством присоединения катиона) с получением их солей. Такие соли сохраняют желаемую биологическую активность ASO без обеспечения нежелательных токсических эффектов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию присутствует в форме натриевой соли. В соответствии с другими вариантами осуществления ASO присутствует в форме калиевой соли.

И.А. Мишень.

Соответственно, ASO согласно настоящему раскрытию является способным к понижающей регуляции (например, к снижению или устранению) экспрессии мРНК SNCA или белка. В связи с этим, ASO согласно настоящему раскрытию могут оказывать воздействие на непрямо ингибирование белка SNCA посредством снижения уровней мРНК SNCA, как правило, в клетке млекопитающего, как например, в человеческой клетке, как например, в нейроне. В частности, настоящее раскрытие направлено на ASO, которые оказывают целенаправленное воздействие на один или несколько участков пре-мРНК SNCA. Синонимы SNCA являются известными и включают в себя NACP, не-A-бета-компонент AD-амилоида, PARK1, PARK4 и PD1. Последовательность для гена SNCA можно найти по общедоступному номеру доступа NC\_000004.12, и частичную последовательность для транскрипта пре-мРНК SNCA (остатки 6001-8400) можно найти по общедоступному номеру доступа NG\_011851.1 (SEQ ID NO: 1). Последовательность для белка SNCA можно найти по общедоступным номерам доступа: P37840, A8K2A4, Q13701, Q4JH13 и Q6IAU6, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в своей полноте. Природные варианты продукта гена SNCA являются известными. Например, природные варианты белка SNCA могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из: A30P, E46K, H50Q, A53T, и любые их комбинации. Таким образом, ASO согласно настоящему раскрытию может быть предназначен для снижения или ингибирования экспрессии природных вариантов белка SNCA.

Известно, что мутации в SNCA вызывают одно или несколько патологических состояний. ASO согласно настоящему раскрытию можно применять для снижения или ингибирования экспрессии SNP или, в качестве альтернативы, подвергнутого сплайсингу транскрипта SNCA, содержащего одну или несколько мутаций, и, следовательно, к снижению образования мутированного белка SNCA. Примеры мутантов белка SNCA включают в себя, без ограничения, белок SNCA, содержащий одну или несколько мутаций, выбранных из: D2A, E35K, Y39F, H50A, E57K, G67\_V71del, V71\_V82del, A76\_V77del, A76del, V77del, A78del, A85\_F94del, Y125F, Y133F, Y136F, и любую их комбинацию. ASO согласно настоящему раскрытию может быть предназначен для снижения или ингибирования экспрессии любых мутантов белка SNCA.

Примером последовательности нуклеиновой кислоты-мишени ASO является пре-мРНК SNCA. SEQ ID NO: 1 на фиг. 1А представляет собой частичную геномную последовательность SNCA (остатки 6001-8400). SEQ ID NO: 1 является идентичной последовательности пре-мРНК SNCA, за исключением того, что нуклеотид "t" в SEQ ID NO: 1 показан как "u" в пре-мРНК. В соответствии с определенными вариантами осуществления "нуклеиновая кислота-мишень" содержит участок интрона кодирующих белок SNCA нуклеиновых кислот или их встречающихся в естественных условиях вариантов и нуклеиновых кислот РНК, полученных из них, например, пре-мРНК. В соответствии с другими вариантами осуществления "нуклеиновая кислота-мишень" содержит участок экзона кодирующих белок SNCA нуклеиновых

кислот или их встречающихся в естественных условиях вариантов и нуклеиновых кислот РНК, полученных из них. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, например, при применении в исследовании или диагностике "нуклеиновая кислота-мишень" может представлять собой кДНК или синтетический олигонуклеотид, полученный из вышеуказанных нуклеиновых кислот-мишеней ДНК или РНК. В соответствии с одним вариантом осуществления частичная геномная последовательность SNCA показана в виде номера доступа GenBank NG\_011851.1 (остатки 6001-8400) (SEQ ID NO: 1). мРНК, кодирующая белок SNCA, показана в виде SEQ ID NO: 2. См., фиг. 1В. Последовательность белка SNCA, кодируемого мРНК SNCA, показана в виде SEQ ID NO: 3. См., фиг. 1С.

В соответствии с одним вариантом осуществления ASO согласно настоящему раскрытию содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной 10-30 нуклеотидов, которые являются комплементарными последовательности нуклеиновой кислоты в пределах транскрипта SNCA, например, участок, соответствующий соединению интрона и экзона в SEQ ID NO: 1, причем последовательность нуклеиновой кислоты соответствует нуклеотидам 7602-7627 в SEQ ID NO: 1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления ASO гибридизируются с участком в пределах транскрипта SNCA или являются комплементарными ему, например, нуклеотидам 7602-7627 в SEQ ID NO: 1, и имеют оценку последовательности, равную или большую приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0. Способы расчета оценки последовательности раскрыты в других местах в данном документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию гибридизируются с соединением интрона и экзона в транскрипте SNCA, например, с участком, соответствующим соединению между интроном 1 и экзоном 2 в SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью нуклеиновой кислоты транскрипта SNCA или участком в пределах последовательности транскрипта SNCA ("участок-мишень"), причем последовательность нуклеиновой кислоты соответствует нуклеотидам 7602-7627 в SEQ ID NO: 1. В соответствии с еще одним вариантом осуществления ASO согласно настоящему раскрытию содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью нуклеиновой кислоты транскрипта SNCA или участком в пределах последовательности транскрипта SNCA, причем последовательность нуклеиновой кислоты соответствует нуклеотидам 7602-7627 в SEQ ID NO: 1, и при этом ASO имеет одну из схем, описанных в данном документе (например, в разделе П.Н, например, схему гэмпера, например, схему гэмпера с чередующимися нуклеотидами во фланкирующих участках), или химическую структуру, показанную в других местах в данном документе (например, фиг. 2 и 3). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок-мишень соответствует нуклеотидам 7604-7620 в SEQ ID NO: 1. В соответствии с другими вариантами осуществления участок-мишень соответствует нуклеотидам 7603-7620 в SEQ ID NO: 1. В соответствии с другими вариантами осуществления участок-мишень соответствует нуклеотидам 7602-7619 в SEQ ID NO: 1. В соответствии с определенными вариантами осуществления ASO гибридизируются с участком в пределах транскрипта SNCA, например, SEQ ID NO: 1, и имеют оценку последовательности, равную или большую приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0. Способы расчета оценки последовательности раскрыты в других местах в данном документе.

В соответствии с определенными вариантами осуществления участок-мишень соответствует нуклеотидам 7602-7627 в SEQ ID NO: 1±10 нуклеотидам на 3'-конце, 5'-конце или на обоих из них. В соответствии с другими вариантами осуществления участок-мишень соответствует нуклеотидам 7604-7620 в SEQ ID NO: 1±1, ±2, ±3, ±4, ±5, ±6, ±7, ±8, ±9 или ±10 нуклеотидам на 3'-конце, 5'-конце или на обоих из них.

В соответствии с определенными вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию является способным к гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью (например, транскриптом SNCA) в физиологических условиях, т.е. в условиях *in vivo*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию является способным к гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью (например, транскриптом SNCA) *in vitro*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию является способным к гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью (например, транскриптом SNCA) *in vitro* в жестких условиях. Условия жесткости для гибридизации *in vitro* зависят, среди прочего, от продуктивного поглощения клеткой, доступности РНК, температуры, свободной энергии ассоциации, концентрации соли и времени (см., например, Stanley T Crooks, *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies and Applications*, 2<sup>nd</sup> Edition, CRC Press (2007)). Обычно условия высокой-умеренной жесткости применяют для гибридизации *in vitro* для обеспечения возможности гибридизации между практически сходными нуклеиновыми кислотами, но не между несходными нуклеиновыми кислотами. Пример жестких условий гибридизации включают в себя гибридизацию в 5× натрий-цитратном буферном солевом растворе (SSC) (0,75 М хлорид натрия/0,075 М цитрат натрия) в течение 1 часа при 40°C с последующей отмывкой образца 10 раз в 1×SSC при 40°C и 5 раз в 1×SSC буфере при комнатной температуре. Условия гибридизации *in vivo* состоят из условий внутри

клетки (например, физиологический pH и условия ионной силы внутри клетки), которые определяют гибридизацию антисмысловых олигонуклеотидов с последовательностями-мишенями. Условия *in vivo* можно имитировать *in vitro* с помощью условий с относительно низкой жесткостью. Например, гибридизацию можно осуществлять *in vitro* в 2×SSC (0,3 М хлорида натрия/0,03 М цитрата натрия), 0,1% SDS при 37°C. Промывочный раствор, содержащий 4×SSC, 0,1% SDS, можно применять при 37°C с окончательной отмывкой в 1×SSC при 45°C.

#### II.B. Последовательности ASO.

ASO согласно настоящему раскрытию содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая соответствует комплементарной последовательности участка транскрипта SNCA, например, нуклеотидную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к ASO, который содержит непрерывную нуклеотидную последовательность с общей длиной 10-30 нуклеотидов, как например, 10-15 нуклеотидов, 10-20 нуклеотидов или 10-25 нуклеотидов, причем непрерывная нуклеотидная последовательность является по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 98%, или по меньшей мере приблизительно на 99% идентичной участку в пределах комплементарной последовательности транскрипта SNCA млекопитающего, такому как SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. ASO могут содержать непрерывную нуклеотидную последовательность, которая является полностью комплементарной (идеально комплементарной) участку нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок SNCA млекопитающих (например, SEQ ID NO: 1 и 2). ASO могут содержать непрерывную нуклеотидную последовательность, которая является полностью комплементарной (идеально комплементарной) последовательности нуклеиновой кислоты или участку в пределах последовательности, соответствующей нуклеотидам X-Y в SEQ ID NO: 1, причем X и Y представляют собой сайт начала пре-мРНК и сайт конца пре-мРНК NG011851.1, соответственно, как показано на фиг. 2. Более того, ASO могут иметь схему, описанную в других местах в данном документе (например, в разделе II.G, например, схему гэмпера, например, схему гэмпера с чередующимися нуклеотидами во фланкирующих участках), или химическую структуру, показанную в других местах в данном документе (например, фиг. 2 и 3). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая является полностью комплементарной (идеально комплементарной) последовательности нуклеиновой кислоты или участку в пределах последовательности, соответствующей нуклеотидам X-Y в SEQ ID NO: 2, причем X и Y представляют собой сайт начала мРНК и сайт конца мРНК, соответственно. В соответствии с определенными вариантами осуществления нуклеотидная последовательность ASO согласно настоящему раскрытию или непрерывная нуклеотидная последовательность является по меньшей мере приблизительно на 80% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 4-21 (т.е. последовательностей на фиг. 2 и 3), как например, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 91%, по меньшей мере приблизительно на 92%, по меньшей мере приблизительно на 93%, по меньшей мере приблизительно на 94%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 97% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 98% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 99% идентичной, как например, приблизительно на 100% идентичной (гомологичной). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO имеет схему, описанную в других местах в данном документе (например, в разделе II.G.I, например, схему гэмпера, например, схему гэмпера с чередующимися нуклеотидами во фланкирующих участках), или химическую структуру нуклеозидов, показанную в других местах в данном документе (например, фиг. 2 и 3).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию содержит по меньшей мере один ASO со схемой (например, номером DES), раскрытой на фиг. 2 и 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию содержит по меньшей мере один ASO со схемой (например, номером DES), раскрытой на фиг. 2 и 3, причем ASO является на один нуклеотид, два нуклеотида, три нуклеотида или четыре нуклеотида короче на 3'-конце, чем ASO, раскрытые на фиг. 2 и 3. В соответствии с другими вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию содержит по меньшей мере один ASO со схемой (например, номером DES), раскрытой на фиг. 2 и 3, причем ASO является на один нуклеотид, два нуклеотида, три нуклеотида или четыре нуклеотида короче на 5'-конце, чем ASO, раскрытые на фиг. 2 и 3. В соответствии с другими вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию содержит по меньшей мере один ASO со схемой (например, номером DES), раскрытой на фиг. 2 и 3, причем ASO является на один нуклеотид, два нуклеотида, три нуклеотида или четыре нуклеотида короче на 5'-конце и/или на 3'-конце, чем ASO, раскрытые на фиг. 2 и 3. В соответствии с другими вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию содержит по меньшей мере один ASO с химической структурой (например, номером ASO), раскрытой на фиг. 2 и 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию содержит по меньшей мере один ASO с химической структурой (например, номе-

ром ASO), раскрытой на фиг. 2 и 3, причем ASO является на один нуклеотид, два нуклеотида, три нуклеотида или четыре нуклеотида короче на 3'-конце, чем ASO, раскрытые на фиг. 2 и 3. В соответствии с другими вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию содержит по меньшей мере один ASO с химической структурой (например, номером ASO), раскрытой на фиг. 2 и 3, причем ASO является на один нуклеотид, два нуклеотида, три нуклеотида или четыре нуклеотида короче на 5'-конце, чем ASO, раскрытые на фиг. 2 и 3. В соответствии с другими вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию содержит по меньшей мере один ASO с химической структурой (например, номером ASO), раскрытой на фиг. 2 и 3, причем ASO является на один нуклеотид, два нуклеотида, три нуклеотида или четыре нуклеотида короче на 5'-конце и/или на 3'-конце, чем ASO, раскрытые на фиг. 2 и 3.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO (или его часть из смежных нуклеотидов) выбран из или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-21, и участок из по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в ней, причем ASO (или его часть из смежных нуклеотидов), необязательно, может содержать одно, два, три или четыре несовпадения по сравнению с соответствующим транскриптом SNCA.

В соответствии с одним вариантом осуществления ASO содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 (например, последовательность ASO-005578 и ASO-005584) и SEQ ID NO: 15 (например, последовательность ASO-005459).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию связывается с последовательностью-мишенью нуклеиновой кислоты (например, транскриптом SNCA) и является способным к ингибированию или снижению экспрессии транскрипта SNCA по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 90% или приблизительно на 100% в ткани (например, области головного мозга) мыши, экспрессирующей человеческий ген SNCA (например, A53T-PAС), при введении *in vivo* в дозах, составляющих 3,13 мкг, 12,5 мкг, 25 мкг, 50 мкг или 100 мкг, по сравнению с контролем (например, внутренним контролем, таким как GADPH или тубулин, или с мышью, которой вводили только контроль со средой) при измерении с помощью анализа, например, количественной ПЦР или анализа QUANTIGENE®, раскрытого в данном документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO являются способными к снижению экспрессии белка SNCA по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70% или по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 90% или приблизительно на 100% в ткани (например, области головного мозга) мыши, экспрессирующей человеческий ген SNCA (например, A53T-PAС), при введении *in vivo* в дозах, составляющих 3,13 мкг, 12,5 мкг, 25 мкг, 50 мкг или 100 мкг, по сравнению с контролем (например, внутренним контролем, таким как GADPH или тубулин, или с мышью, которой вводят только контроль со средой) при измерении с помощью анализа, например, анализа высокого содержания, раскрытого в данном документе (см. пример 2А).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию связываются с последовательностью-мишенью нуклеиновой кислоты (например, транскриптом SNCA) и являются способными к ингибированию или снижению экспрессии транскрипта SNCA по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 90% или приблизительно на 100% в ткани (например, области головного мозга) яванского макака, экспрессирующего ген SNCA дикого типа, при введении один раз или два раза *in vivo* в дозах, составляющих 2 мг, 4 мг или 8 мг, по сравнению с контролем (например, внутренним контролем, таким как GADPH или тубулин, или с яванским макаком, которому вводят только контроль со средой) при измерении с помощью анализа, например, количественной ПЦР или анализа QUANTIGENE®, раскрытого в данном документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO являются способными к снижению экспрессии белка SNCA по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 90% или приблизительно на 100% в ткани (например, области головного мозга) яванского макака, экспрессирую-

шего ген SNCA дикого типа, при введении один раз или два раза *in vivo* в дозах, составляющих 2 мг, 4 мг или 8 мг, по сравнению с контролем (например, внутренним контролем, таким как GADPH или тубулин, или с яванским макаком, которому вводят только контроль со средой) при измерении с помощью анализа, например, анализа высокого содержания, раскрытого в данном документе (см. пример 2A).

В соответствии с другими вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию являются способными к снижению экспрессии мРНК SNCA *in vitro* по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 90% или приблизительно на 100% в мышинных первичных нейронах, экспрессирующих полноразмерный человеческий ген SNCA (например, PAC нейронах), когда нейроны находятся в контакте с 5 мкМ, 3,3 мкМ, 1 мкМ, 4 нМ, 40 нМ или 200 нМ антисмыслового олигонуклеотида, по сравнению с контролем (например, внутренним контролем, таким как GADPH или тубулин, или с мышинными первичными нейронами, экспрессирующими полноразмерный человеческий ген SNCA при контакте только с солевым раствором) при измерении с помощью анализа, например, анализа QUANTIGENE®, раскрытого в данном документе.

В соответствии с другими вариантами осуществления ASO являются способными к снижению экспрессии белка SNCA *in vitro* по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 90% или по меньшей мере приблизительно на 95% в мышинных первичных нейронах, экспрессирующих полноразмерный человеческий ген SNCA (например, PAC нейронах), когда нейроны находятся в контакте с 5 мкМ, 3,3 мкМ, 1 мкМ, 4 нМ, 40 нМ или 200 нМ антисмыслового олигонуклеотида, по сравнению с контролем (например, внутренним контролем, таким как GADPH или тубулин, или с мышинными первичными нейронами, экспрессирующими полноразмерный человеческий ген SNCA (при контакте только с солевым раствором) при измерении с помощью анализа, например, анализа высокого содержания, раскрытого в данном документе (см. пример 2A).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO являются способными к снижению экспрессии мРНК SNCA *in vitro* по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 90% или приблизительно на 100% в клеточной линии нейроblastомы человека (например, SK-N-BE(2)), экспрессирующей полноразмерный человеческий ген SNCA, когда клетки нейроblastомы находятся в контакте с 25 мкМ антисмысловым олигонуклеотидом, по сравнению с контролем (например, внутренним контролем, таким как GADPH или тубулин, или с клетками нейроblastомы, экспрессирующими полноразмерный человеческий ген SNCA при контакте только с солевым раствором) при измерении с помощью анализа, например, количественной ПЦР, раскрытой в данном документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO, раскрытые в данном документе, являются способными к снижению экспрессии белка SNCA *in vitro* по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 90% или приблизительно на 100% в клеточной линии нейроblastомы человека (например, SK-N-BE(2)), экспрессирующей полноразмерный человеческий ген SNCA, когда клетки нейроblastомы находятся в контакте с 25 мкМ антисмыслового олигонуклеотида, по сравнению с контролем (например, внутренним контролем, таким как GADPH или тубулин, или с клетками нейроblastомы, экспрессирующими полноразмерный человеческий ген SNCA при контакте только с солевым раствором) при измерении с помощью анализа, например, анализа высокого содержания, раскрытого в данном документе (см. пример 2A).

В соответствии с определенными вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию связываются с транскриптом SNCA и ингибируют или снижают экспрессию мРНК SNCA по меньшей мере приблизительно на 10% или приблизительно на 20% по сравнению с нормальным (т.е. контрольным) уровнем экспрессии в клетке, например, по меньшей мере приблизительно на 30%, приблизительно на 40%, приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 70%, приблизительно на 80%, приблизительно на 90% или приблизительно на 95% по сравнению с нормальным уровнем экспрессии (таким как уровень экспрессии в отсутствие ASO или конъюгата(конъюгатов)) в клетке. В соответствии с определенными вариантами осуществления ASO снижает экспрессию белка SNCA в клетке после введения ASO по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% по сравнению с клеткой, не подвергающейся воздействию ASO (т.е. контролем). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO снижает экспрессию белка SNCA в клетке после введения ASO по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80% или по меньшей мере приблизительно на 90% по сравнению

нию с клеткой, не подвергающейся воздействию ASO (т.е. контролем).

В соответствии с определенными вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию имеет по меньшей мере одно свойство, выбранное из следующих: (1) снижает экспрессию мРНК SNCA в клетке по сравнению с контрольной клеткой, которая не подвергалась воздействию ASO; (2) не снижает значительно колебания уровней кальция в клетке; (3) не снижает значительно интенсивность окрашивания тубулина в клетке; (4) снижает экспрессию белка  $\alpha$ -Суп в клетке; и (5) любые их комбинации по сравнению с контрольной клеткой, которая не подвергалась воздействию ASO.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию не снижает значительно колебания уровней кальция в клетке, например, в нейронах. Если ASO не снижает значительно колебания уровней кальция в клетке, это свойство ASO соответствует пониженной нейротоксичности ASO. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления колебания уровней кальция являются большими или равными 95%, большими или равными 90%, большими или равными 85%, большими или равными 80%, большими или равными 75%, большими или равными 70%, большими или равными 65%, большими или равными 60%, большими или равными 55% или большими или равными 50% колебаний в клетке, не подвергающейся воздействию ASO. Колебания уровней кальция являются важными для надлежащего функционирования нейронов. Было показано, что сети кортикальных нейронов подвергаются спонтанным колебаниям уровней кальция, приводящим в результате к высвобождению нейромедиатора-глутамата. Колебания уровней кальция также могут регулировать взаимодействия нейронов со связанной глией помимо других связанных нейронов в сети, высвобождая другие нейромедиаторы помимо глутамата. Регулируемые колебания уровней кальция требуются для гомеостаза нейронных сетей для нормального функционирования головного мозга. (См., Shashank et al., *Brain Research*, 1006(1): 8-17 (2004); Rose et al., *Nature Neurosci.*, 4:773 - 774 (2001); Zonta et al., *J Physiol Paris.*, 96(3-4):193-8 (2002); Pasti et al., *J. Neurosci.*, 21(2): 477-484 (2001).) Глутамат также активирует два отдельных ионных канала, рецепторы  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA) и рецепторы N-метил-D-аспартата (NMDA).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления колебания уровней кальция, измеряемые в данных способах, представляют собой AMPA-зависимые колебания уровней кальция. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления колебания уровней кальция представляют собой NMDA-зависимые колебания уровней кальция. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления колебания уровней кальция представляют собой гамма-аминомасляная кислота (GABA)-зависимые колебания уровней кальция. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления колебания уровней кальция могут представлять собой комбинацию двух или более из AMPA-зависимых, NMDA-зависимых или GABA-зависимых колебаний уровней кальция.

В соответствии с определенными вариантами осуществления колебания уровней кальция, измеряемые в данных способах, представляют собой AMPA-зависимые колебания уровней кальция. Для того чтобы измерить AMPA-зависимые колебания уровней кальция, колебания уровней кальция можно измерить в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  (например,  $MgCl_2$ ). В соответствии с определенными вариантами осуществления способ дополнительно предусматривает добавление ионов  $Mg^{2+}$  (например,  $MgCl_2$ ) в количестве, которое обеспечивает возможность выявления AMPA-зависимых колебаний уровней кальция. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления эффективная концентрация ионов, обеспечивающая возможность выявления AMPA-зависимых колебаний уровней кальция, составляет по меньшей мере приблизительно 0,5 мМ. В соответствии с другими вариантами осуществления эффективная концентрация ионов для индукции AMPA-зависимых колебаний уровней кальция составляет по меньшей мере приблизительно 0,6 мМ, по меньшей мере приблизительно 0,7 мМ, по меньшей мере приблизительно 0,8 мМ, по меньшей мере приблизительно 0,9 мМ, по меньшей мере приблизительно 1 мМ, по меньшей мере приблизительно 1,5 мМ, по меньшей мере приблизительно 2,0 мМ, по меньшей мере приблизительно 2,5 мМ, по меньшей мере приблизительно 3,0 мМ, по меньшей мере приблизительно 4 мМ, по меньшей мере приблизительно 5 мМ, по меньшей мере приблизительно 6 мМ, по меньшей мере приблизительно 7 мМ, по меньшей мере приблизительно 8 мМ, по меньшей мере приблизительно 9 мМ или по меньшей мере приблизительно 10 мМ. В соответствии с конкретным вариантом осуществления концентрация ионов  $Mg^{2+}$  (например,  $MgCl_2$ ), пригодная для способов, составляет 1 мМ. В соответствии с определенными вариантами осуществления концентрация ионов  $Mg^{2+}$  (например,  $MgCl_2$ ), пригодная для данных способов, составляет от приблизительно 1 мМ до приблизительно 10 мМ, от приблизительно 1 мМ до приблизительно 15 мМ, от приблизительно 1 мМ до приблизительно 20 мМ или от приблизительно 1 мМ до приблизительно 25 мМ. Ионы  $Mg^{2+}$  можно добавлять посредством добавления солей магния, таких как карбонат магния, хлорид магния, цитрат магния, гидроксид магния, оксид магния, сульфат магния и гептагидрат сульфата магния.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления колебания уровней кальция измеряют в данном способе посредством применения флуоресцентных зондов, которые выявляют колебания уровней внутриклеточного кальция. Например, выявление потока внутриклеточного кальция может быть достигнуто посредством окрашивания клеток флуоресцентными красителями, которые связываются с иона-

ми кальция (известными как флуоресцентные кальциевые индикаторы) с получаемым в результате выявляемым изменением флуоресценции (например, красители Fluo-4 AM и Fura Red AM, доступные от Molecular Probes. Юджин, Орегон, США).

В соответствии с другими вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию не снижают значительно интенсивность окрашивания тубулина в клетке. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления интенсивность окрашивания тубулина является большей или равной 95%, большей или равной 90%, большей или равной 85%, большей или равной 80%, большей или равной 75%, большей или равной 70%, большей или равной 65%, большей или равной 60%, большей или равной 55%, или большей или равной 50% интенсивности окрашивания тубулина в клетке, не подвергавшейся воздействию ASO (или подвергавшийся воздействию солевого раствора).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такое свойство наблюдают при применении концентрации ASO согласно настоящему раскрытию от 0,04 нМ до 400 мкМ. В том же или отличающемся варианте осуществления ингибирование или снижение экспрессии мРНК SNCA и/или белка SNCA в клетке приводит в результате к уровням мРНК или белка, составляющим менее чем 100%, как например, менее чем 98%, менее чем 95%, менее чем 90%, менее чем 80%, как например, менее чем 70% по сравнению с клетками, не подвергавшимися воздействию ASO. Модуляцию уровня экспрессии можно определить посредством измерения уровней белка SNCA, например, с помощью таких способов, как SDS-PAGE с последующим Вестерн-блоттингом с применением подходящих антител, индуцированных против белка-мишени. В качестве альтернативы, модуляцию уровней экспрессии можно определить посредством измерения уровней мРНК SNCA, например, с помощью Нозерн-блоттинга или количественной ОТ-ПЦР. При измерении ингибирования на основании уровней мРНК уровень понижающей регуляции при применении соответствующей дозировки, такой как концентрация от приблизительно 0,04 нМ до приблизительно 400 мкМ, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, как правило, представляет собой уровень, составляющий приблизительно от 10-20% нормальных уровней в клетке в отсутствие ASO.

В соответствии с определенными вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию характеризуется переносимостью *in vivo*, меньшей или равной общей оценке 4, причем общая оценка представляет собой сумму балльных оценок по пяти категориям, которые представляют собой 1) гиперактивность; 2) пониженную активность и возбуждение; 3) двигательную дисфункцию и/или атаксию; 4) ненормальное положение тела и дыхание и 5) тремор и/или конвульсии, и при этом балльную оценку по каждой категории измеряют по шкале 0-4. В соответствии с определенными вариантами осуществления переносимость *in vivo* является меньшей или равной общей оценке 3, общей оценке 2, общей оценке 1 или общей оценке 0. В соответствии с одним вариантом осуществления оценку переносимости *in vivo* определяют, как описано в примерах ниже.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO может допускать 1, 2, 3 или 4 (или больше) несовпадения при гибридизации с последовательностью-мишенью и при этом все еще в достаточной мере связываться с мишенью, демонстрируя желаемый эффект, т.е. понижающую регуляцию целевой мРНК и/или белка. Например, несовпадения могут компенсироваться увеличенной длиной нуклеотидной последовательности ASO и/или повышенным количеством нуклеотидных аналогов, которые раскрыты в других местах в данном документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию содержит не более чем 3 несовпадения при гибридизации с последовательностью-мишенью. В соответствии с другими вариантами осуществления непрерывная нуклеотидная последовательность содержит не более чем 2 несовпадения при гибридизации с последовательностью-мишенью. В соответствии с другими вариантами осуществления непрерывная нуклеотидная последовательность содержит не более чем 1 несовпадение при гибридизации с последовательностью-мишенью.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию содержит нуклеотидную последовательность или участок в пределах последовательности согласно любой из SEQ ID NO: 4-21, последовательности ASO со схемой, которая описана на фиг. 2 и 3, и последовательность ASO с химической структурой, которая описана на фиг. 2 и 3.

Тем не менее, предполагают, что в соответствии с некоторыми вариантами осуществления нуклеотидная последовательность ASO может содержать дополнительные нуклеотиды на 5'- или 3'-конце, как например, независимо, 1, 2, 3, 4 или 5 дополнительных нуклеотидов на 5'- и/или 3'-конце, которые являются некомплементарными последовательности-мишени. В связи с этим, ASO согласно настоящему раскрытию в соответствии с некоторыми вариантами осуществления могут содержать непрерывную нуклеотидную последовательность, которая фланкирована дополнительными нуклеотидами на 5'- и/или 3'-конце. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительные нуклеотиды на 5'- и/или 3'-конце представляют собой встречающиеся в естественных условиях нуклеотиды, такие как ДНК или РНК.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию имеет оценку последовательности, большую или равную 0,2, причем оценку последовательности рассчитывают с помощью формулы I:

кол-во нуклеотидов С и их аналогов – кол-во нуклеотидов G и их аналогов (I)

общая длина в нуклеотидах.

В соответствии с другими вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию имеет оценку последовательности, большую или равную 0,2, причем оценку последовательности рассчитывают с помощью формулы IA:

кол-во нуклеотидов С и нуклеотидов 5-метилцитозина – количество нуклеотидов G (IA)

общая длина нуклеотидов.

В этих вариантах осуществления оценка последовательности, большая или равная пороговому значению, соответствует пониженной нейротоксичности ASO. В соответствии с определенными вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию имеет оценку последовательности, большую или равную приблизительно 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 или 1,0. В соответствии с одним вариантом осуществления ASO согласно настоящему раскрытию содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, гибридизирующуюся с некодирующим участком в транскрипте SNCA, причем оценка последовательности ASO является большей или равной приблизительно 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 или 1,0. В соответствии с еще одним вариантом осуществления ASO согласно настоящему раскрытию содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, гибридизирующуюся с участком интрона в транскрипте SNCA, причем оценка последовательности ASO является большей или равной приблизительно 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 или 1,0. В соответствии с еще одним вариантом осуществления ASO согласно настоящему раскрытию содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, гибридизирующуюся с соединением интрона и экзона в транскрипте SNCA, причем оценка последовательности ASO является большей или равной приблизительно 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 или 1,0. В соответствии со всеми этими вариантами осуществления, когда оценка последовательности является большей или равной пороговому значению, ASO считается имеющим пониженную нейротоксичность.

## II.C. Длина ASO.

ASO могут содержать непрерывную нуклеотидную последовательность с общей длиной 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 смежных нуклеотидов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO содержат непрерывную нуклеотидную последовательность с общей длиной приблизительно 10-22, как например, 10-21 или 12-18, как например, 13-17 или 12-16, как например, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 смежных нуклеотид.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO содержат непрерывную нуклеотидную последовательность с общей длиной 16, 17, 18, 19 или 20 (16-20) смежных нуклеотидов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию состоит не более чем из 22 нуклеотидов, как например, не более чем из 21 или 20 нуклеотидов, как например, не более чем из 18 нуклеотидов, как например, из 15, 16 или 17 нуклеотидов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию содержит менее 22 нуклеотида. Следует понимать, что в случае, когда задан диапазон для длины ASO или непрерывной нуклеотидной последовательности, диапазон включает в себя нижние и верхние значения длины, представленные в диапазоне, например от (или от и до) 10-30, включает в себя и 10, и 30.

## II.D. Нуклеозиды и нуклеозидные аналоги.

В соответствии с одним аспектом настоящего раскрытия ASO содержат один или несколько не встречающихся в естественных условиях нуклеотидных аналогов. "Нуклеотидные аналоги" в контексте данного документа представляют собой варианты природных нуклеотидов, таких как нуклеотиды ДНК или РНК, полученные посредством модификаций в сахарном фрагменте и/или фрагменте основания. Аналоги, в принципе, могут быть просто "молчащими" или "эквивалентными" природным нуклеотидам в контексте олигонуклеотида, т.е. не оказывают функционального воздействия на способ, посредством которого работает олигонуклеотид, ингибируя экспрессию гена-мишени. Тем не менее, такие "эквивалентные" аналоги могут быть полезными, например, если они проще или дешевле в производстве, или являются более стабильными при условиях хранения или производства, или представляют собой маркер или метку. Тем не менее, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления аналоги будут оказывать функциональное воздействие на способ, посредством которого работает ASO, ингибируя экспрессию; например, посредством обеспечения повышенной аффинности связывания с мишенью, и/или повышенной устойчивости к внутриклеточным нуклеазам, и/или улучшенного облегчения транспорта в клетку. Конкретные примеры нуклеозидных аналогов описаны, например, Freier & Altman; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443; и Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213, и на схеме 1.

## II.D.1. Нуклеотидное основание.

Термин "нуклеотидное основание" включает в себя пуриновый (например, аденин и гуанин) и пиримидиновый (например, урацил, тимин и цитозин) фрагмент, присутствующий в нуклеозидах и нуклеотидах, которые образуют водородные связи при гибридизации нуклеиновых кислот. В контексте настоящего раскрытия термин "нуклеотидное основание" также охватывает модифицированные нуклеотидные основания, которые могут отличаться от встречающихся в естественных условиях нуклеотидных основа-

ний, но являются функциональными при гибридизации нуклеиновых кислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фрагмент нуклеотидного основания модифицируют посредством модификации или замены нуклеотидного основания. В этом контексте "нуклеотидное основание" относится к встречающимся в естественных условиях нуклеотидным основаниям, таким как аденин, гуанин, цитозин, тимидин, урацил, ксантин и гипоксантин, а также к не встречающимся в естественных условиях вариантам. Такие варианты описаны, например, в Hirao et al. (2012) *Accounts of Chemical Research* vol 45 page 2055, и Bergstrom (2009) *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Suppl.* 37 1.4.1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фрагмент нуклеотидного основания является модифицированным посредством замены пурина или пиримидина на модифицированный пурин или пиримидин, такой как замещенный пурин или замещенный пиримидин, как например, нуклеотидное основание, выбранное из изоцитозина, псевдоизоцитозина, 5-метил-цитозина, 5-тиазоло-цитозина, 5-пропинил-цитозина, 5-пропинил-урацила, 5-бром урацила, 5-тиазоло-урацила, 2-тио-урацила, 2'-тио-тимина, инозина, диаминопурина, 6-аминопурина, 2-аминопурина, 2,6-диаминопурина и 2-хлор-6-аминопурина.

Фрагменты нуклеотидных оснований могут быть обозначены буквенным кодом для каждого соответствующего нуклеотидного основания, например, А, Т, G, С или U, причем каждая буква может необязательно включать в себя модифицированные нуклеотидные основания с эквивалентной функцией. Например, в иллюстративных олигонуклеотидах фрагменты нуклеотидных оснований являются выбранными из А, Т, G, С и 5-метилцитозина. Необязательно, для гѐпмеров LNA можно применять 5-метилцитозиновые нуклеозиды LNA.

#### II.D.2. Модификация сахара.

ASO согласно настоящему раскрытию могут содержать один или несколько нуклеозидов, которые имеют модифицированный сахарный фрагмент, т.е. модификацию сахарного фрагмента по сравнению с фрагментом сахара-рибозы, находящимся в ДНК и РНК. Были получены многочисленные нуклеозиды с модификацией фрагмента сахара-рибозы, в первую очередь, с целью улучшения определенных свойств олигонуклеотидов, таких как аффинность и/или устойчивость к нуклеазам.

Такие модификации включают в себя те модификации, при которых модифицируется структура рибозного кольца, например, посредством замены на гексозное кольцо (HNA) или бициклическое кольцо, которое, как правило, имеет бирадикальный мостик между C2' и C4' углеродами на рибозном конце (LNA), или разъединенное рибозное кольцо, в котором, как правило, отсутствует связь между C2' и C3' углеродами (например, UNA). Другие нуклеозиды с модифицированным сахаром включают в себя, например, нуклеиновые кислоты с бициклогексозой (международная заявка WO2011/017521) или нуклеиновые кислоты с трициклическими сахарами (международная заявка WO2013/154798). Модифицированные нуклеозиды также включают в себя нуклеозиды, в которых сахарный фрагмент заменен на фрагмент, отличный от сахара, например, в случае пептидонуклеиновых кислот (PNA) или морфолинонуклеиновых кислот.

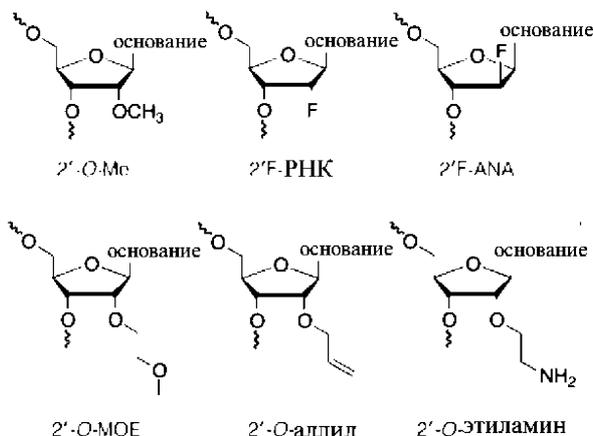
Модификации сахаров также включают в себя модификации, выполненные посредством замены замещающих групп на рибозном кольце на группы, отличные от водорода, или 2'-ОН группу, обнаруживающуюся в естественных условиях в нуклеозидах РНК. Например, заместители можно вводить в положениях 2', 3', 4' или 5'. Нуклеозиды с модифицированными фрагментами также включают в себя 2'-модифицированные нуклеозиды, как например, 2'-замещенные нуклеозиды. Действительно, большое внимание было уделено разработке 2'-замещенных нуклеозидов, и было обнаружено, что многочисленные 2'-замещенные нуклеозиды имеют полезные свойства при включении в олигонуклеотиды, такие как повышенная устойчивость нуклеозида и повышенная аффинность.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модификация сахара содержит усиливающую аффинность модификацию сахара, например, LNA. Усиливающая аффинность модификация сахара повышает аффинность связывания ASO в последовательности-мишени РНК (например, соединение интрона 1/экзона 2 в мРНК SNCA). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO, содержащий модификацию сахара, раскрытую в данном документе, характеризуется аффинностью связывания с последовательностью-мишенью РНК, которая усилена по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 100% по сравнению с контролем (например, ASO без такой модификации сахара).

##### II.D.2.a. Модифицированные по 2'-атому нуклеозиды.

Модифицированный по 2'-атому сахара нуклеозид, который имеет заместитель, отличный от Н или -ОН, в положении 2' (2'-замещенный нуклеозид) или содержит 2'-связанный бирадикал, и включает в себя 2'-замещенные нуклеозиды и LNA (2'-4'-соединенные бирадикальным мостиком) нуклеозиды. Например, 2'-модифицированный сахар может обеспечивать повышенную аффинность связывания и/или повышенную устойчивость олигонуклеотида к нуклеазам. Примерами 2'-замещенных модифицированных нуклеозидов являются 2'-О-алкил-РНК, 2'-О-метил-РНК, 2'-алкокси-РНК, 2'-О-метоксиэтил-РНК (МОЕ), 2'-амино-ДНК, 2'-фтор-РНК и нуклеозид 2'-F-ANA. Для дополнительных примеров, см., напри-

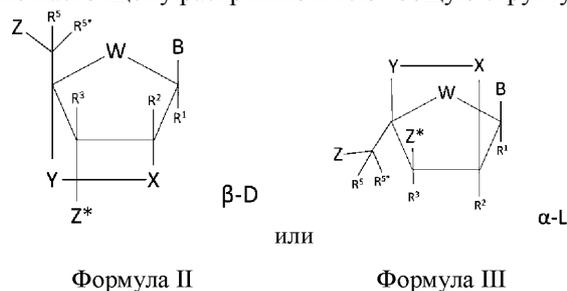
мер, Freier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443; и Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213, и Deleavey and Damha, Chemistry and Biology 2012, 19, 937. Ниже представлены иллюстрации некоторых 2'-замещенных модифицированных нуклеозидов.



#### II.D.2.b. Нуклеозиды закрытой нуклеиновой кислоты (LNA).

Нуклеозиды LNA представляют собой модифицированные нуклеозиды, которые содержат линкерную группу (называемую бирадикалом или мостиком) между C2' и C4' атомами кольца рибозного сахара в нуклеотиде. Эти нуклеозиды также называют в литературных источниках мостиковой нуклеиновой кислотой или бициклической нуклеиновой кислотой (BNA).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированный нуклеозид или нуклеозиды LNA в ASO согласно настоящему раскрытию имеют общую структуру формулы II или III:



причем W является выбранным из -O-, -S-, -N(R<sup>a</sup>)-, -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-, как например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления -O-; B обозначает фрагмент нуклеотидного основания или модифицированного нуклеотидного основания; Z обозначает межнуклеозидный мостик к смежному нуклеозиду или 5'-концевую группу; Z\* обозначает межнуклеозидный мостик к смежному нуклеозиду или 3'-концевую группу; и X обозначает группу, выбранную из группы, состоящей из -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-, -C(R<sup>a</sup>)=C(R<sup>b</sup>)-, -C(R<sup>a</sup>)=N-, -O-, -Si(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>-, -S-, -SO<sub>2</sub>-, -N(R<sup>a</sup>)- и >C=Z. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X является выбранным из группы, состоящей из: -O-, -S-, NH-, NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-, -CH<sub>2</sub>-, CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-, -C(=CH<sub>2</sub>)- и -C(=CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X представляет собой -O-. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Y обозначает группу, выбранную из группы, состоящей из -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-, -C(R<sup>a</sup>)=C(R<sup>b</sup>)-, -C(R<sup>a</sup>)=N-, -O-, -Si(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>-, -S-, -SO<sub>2</sub>-, -N(R<sup>a</sup>)- и >C=Z. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Y является выбранным из группы, состоящей из: -CH<sub>2</sub>-, -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-, -C(R<sup>a</sup>)=C(R<sup>b</sup>)- и -C(R<sup>a</sup>)=N-.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Y является выбранным из группы, состоящей из: -CH<sub>2</sub>-, -CHR<sup>a</sup>-, -CHCH<sub>3</sub>-, CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>- и -X-Y- вместе обозначают двухвалентную линкерную группу (также называемую радикалом), вместе определяют двухвалентную линкерную группу, состоящую из 1, 2, 3 или 4 групп/атомов, выбранных из группы, состоящей из -C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-, -C(R<sup>a</sup>)=C(R<sup>b</sup>)-, -C(R<sup>a</sup>)=N-, -O-, -Si(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>-, -S-, -SO<sub>2</sub>-, -N(R<sup>a</sup>)- и >C=Z.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления -X-Y обозначает бирадикал, выбранный из групп, состоящих из: -X-CH<sub>2</sub>-, -X-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-, -X-CHR<sup>a</sup>-, -X-C(HCH<sub>3</sub>)-, -O-Y-, -O-CH<sub>2</sub>-, -S-CH<sub>2</sub>-, -NH-CH<sub>2</sub>-, -O-CHCH<sub>3</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -O-CH(CH<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>)-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, OCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -O-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-, -O-NCH<sub>2</sub>-, -C(=CH<sub>2</sub>)-CH<sub>2</sub>-, -NR<sup>a</sup>-CH<sub>2</sub>-, N-O-CH<sub>2</sub>-, -S-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>- и -S-CHR<sup>a</sup>-. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления -X-Y- обозначает -O-CH<sub>2</sub>-или -O-CH(CH<sub>3</sub>)-.

В соответствии с определенными вариантами осуществления Z является выбранным из -O-, -S- и -N(R<sup>a</sup>)-, и каждый из R<sup>a</sup> и, если присутствует, R<sup>b</sup>, является независимо выбранным из водорода, необяза-

тельно замещенного C<sub>1-6</sub>-алкила, необязательно замещенного C<sub>2-6</sub>-алкенила, необязательно замещенного C<sub>2-6</sub>-акинила, гидрокси, необязательно замещенного C<sub>1-6</sub>-алкокси, C<sub>2-6</sub>-алкоксиалкила, C<sub>2-6</sub>-алкенилокси, карбокси, C<sub>1-6</sub>-алкоксикарбонила, C<sub>1-6</sub>-алкилкарбонила, формила, арила, арилокси-карбонила, арилокси, арилкарбонила, гетероарила, гетероарилокси-карбонила, гетероарилокси, гетероарилкарбонила, amino, моно- и ди(C<sub>1-6</sub>-алкил)амино, карбамоила, моно- и ди(C<sub>1-6</sub>-алкил)-амино-карбонила, amino-C<sub>1-6</sub>-алкил-аминокарбонила, моно- и ди(C<sub>1-6</sub>-алкил)амино-C<sub>1-6</sub>-алкил-аминокарбонила, C<sub>1-6</sub>-алкил-карбониламино, карбамидо, C<sub>1-6</sub>-алканоилокси, сульфоно, C<sub>1-6</sub>-алкилсульфонилокси, нитро, азидо, сульфанила, C<sub>1-6</sub>-алкилтио, галогена, причем арил и гетероарил могут быть необязательно замещенными, и при этом два присоединенных к одному и тому же атому заместителя R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> вместе могут определять необязательно замещенный метилен (=CH<sub>2</sub>), причем для всех хиральных центров асимметрические группы могут находиться либо в R, либо в S ориентации.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> являются независимо выбранными из группы, состоящей из: водорода, необязательно замещенного C<sub>1-6</sub>-алкила, необязательно замещенного C<sub>2-6</sub>-алкенила, необязательно замещенного C<sub>2-6</sub>-алкинила, гидрокси, C<sub>1-6</sub>-алкокси, C<sub>2-6</sub>-алкоксиалкила, C<sub>2-6</sub>-алкенилокси, карбокси, C<sub>1-6</sub>-алкоксикарбонила, C<sub>1-6</sub>-алкилкарбонила, формила, арила, арилокси-карбонила, арилокси, арилкарбонила, гетероарила, гетероарилокси-карбонила, гетероарилокси, гетероарилкарбонила, amino, моно- и ди(C<sub>1-6</sub>-алкил)амино, карбамоила, моно- и ди(C<sub>1-6</sub>-алкил)-амино-карбонила, amino-C<sub>1-6</sub>-алкил-аминокарбонила, моно- и ди(C<sub>1-6</sub>-алкил)амино-C<sub>1-6</sub>-алкил-аминокарбонила, C<sub>1-6</sub>-алкил-карбониламино, карбамидо, C<sub>1-6</sub>-алканоилокси, сульфоно, C<sub>1-6</sub>-алкилсульфонилокси, нитро, азидо, сульфанила, C<sub>1-6</sub>-алкилтио и галогена, причем арил и гетероарил могут быть необязательно замещенными, и при этом два присоединенных к одному и тому же атому заместителя вместе могут определять оксо, тиоксо, имино или необязательно замещенный метилен.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> являются независимо выбранными из C<sub>1-6</sub>-алкила, такого как метил, и водорода.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления все из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> представляют собой водород.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления все из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> представляют собой водород, и один из R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> также представляет собой водород, а другой из R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> является отличным от водорода, таким как C<sub>1-6</sub>-алкил, таким как метил.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления R<sup>a</sup> представляет собой или водород, или метил. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления R<sup>b</sup>, если он присутствует, представляет собой или водород, или метил.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или оба из R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> представляют собой водород.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один из R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> представляет собой водород, а другой является отличным от водорода.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один из R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> представляет собой метил, а другой представляет собой водород.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления оба из R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> представляют собой метил.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бирадикал -X-Y-представляет собой -O-CH<sub>2</sub>-, W представляет собой O, и все из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> представляют собой водород. Такие нуклеозиды LNA раскрыты в международных заявках WO99/014226, WO00/66604, WO98/039352 и WO2004/046160, все из которых тем самым включены посредством ссылки, и включают в себя те, которые обычно известны как нуклеозиды бета-D-окси-LNA и альфа-L-окси-LNA.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бирадикал -X-Y-представляет собой -S-CH<sub>2</sub>-, W представляет собой O, и все из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> представляют собой водород. Такие нуклеозиды тимо-LNA раскрыты в международных заявках WO99/014226 и WO2004/046160.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бирадикал -X-Y-представляет собой -NH-CH<sub>2</sub>-, W представляет собой O, и все из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> представляют собой водород. Такие нуклеозиды amino-LNA раскрыты в международных заявках WO99/014226 и WO2004/046160.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бирадикал -X-Y-представляет собой -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- или -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, W представляет собой O, и все из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> представляют собой водород. Такие нуклеозиды LNA раскрыты в международной заявке WO00/047599 и Morita et al., Bioorganic & Med.Chem. Lett. 12 73-76, которые тем самым включены в данный документ посредством ссылки, и включают в себя те, которые обычно известны как 2'-O-4'C-этилен-мостиковые нуклеиновые кислоты (ENA).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бирадикал -X-Y-представляет собой -O-CH<sub>2</sub>-, W представляет собой O, и все из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и один из R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> представляют собой водород, а другой из R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> часто является отличным от водорода, таким как C<sub>1-6</sub>-алкил, таким как метил. Такие 5'-замещенные нуклеозиды LNA раскрыты в международной заявке WO2007/134181.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бирадикал -X-Y-представляет собой -O-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-, причем один или оба из R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> являются отличными от водорода, такими как метил, W пред-

ставляет собой O, и все из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и один из R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> представляют собой водород, а другой из R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> является отличным от водорода, таким как C<sub>1-6</sub>алкил, таким как метил. Такие бис-модифицированные нуклеозиды LNA раскрыты в международной заявке WO2010/077578.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бирадикал -X-Y- обозначает двухвалентную линкерную группу -O-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)- (2'O-метоксиэтил-бициклическая нуклеиновая кислота - Seth et al., 2010, J. Org. Chem. Vol 75(5) pp. 1569-81). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бирадикал -X-Y- обозначает двухвалентную линкерную группу -O-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)- (2'O-этил бициклическая нуклеиновая кислота - Seth et al., 2010, J. Org. Chem. Vol 75(5) pp. 1569-81). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бирадикал -X-Y- представляет собой -O-CHR<sup>a</sup>-, W представляет собой O, и все из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> представляют собой водород. Такие б'-замещенные нуклеозиды LNA раскрыты в международных заявках WO10036698 и WO07090071.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бирадикал -X-Y-представляет собой -O-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-, W представляет собой O, и все из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> представляют собой водород. Такие нуклеозиды LNA также являются известными в уровне техники как циклические MOE (сMOE) и раскрыты в международной заявке WO07090071. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бирадикал -X-Y- обозначает двухвалентную линкерную группу -O-CH(CH<sub>3</sub>)-, либо в R-, либо в S-конфигурации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бирадикал -X-Y- вместе обозначает двухвалентную линкерную группу -O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>- (Seth et al., 2010, J. Org. Chem). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бирадикал -X-Y- представляет собой -O-CH(CH<sub>3</sub>)-, W представляет собой O, и все из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> представляют собой водород. Такие нуклеозиды б'-метил-LNA также являются известными в уровне техники как сET нуклеозиды, и они могут представлять собой либо (S)cET, либо (R)cET стереоизомеры, которые раскрыты в международных заявках WO07090071 (бета-D) и WO2010/036698 (альфа-L)).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бирадикал -X-Y-представляет собой -O-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-, причем ни R<sup>a</sup>, ни R<sup>b</sup> не представляет собой водород, W представляет собой O, и все из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> представляют собой водород. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления оба из R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> представляют собой метил. Такие б' ди-замещенные нуклеозиды LNA раскрыты в международной заявке WO 2009006478.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бирадикал -X-Y-представляет собой -S-CHR<sup>a</sup>-, W представляет собой O, и все из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> представляют собой водород. Такие б'-замещенные нуклеозиды тио-LNA раскрыты в международной заявке WO11156202. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления б'-замещенных тио-LNA R<sup>a</sup> представляет собой метил.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бирадикал -X-Y-представляет собой -C(=CH<sub>2</sub>)-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-, такой как -C(=CH<sub>2</sub>)-CH<sub>2</sub>- или -C(=CH<sub>2</sub>)-CH(CH<sub>3</sub>)-, W представляет собой O, и все из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> представляют собой водород. Такие нуклеозиды винил-карбо-LNA раскрыты в международных заявках WO08154401 и WO09067647.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бирадикал -X-Y-представляет собой -N(-OR<sup>a</sup>)-, W представляет собой O, и все из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> представляют собой водород. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления R<sup>a</sup> представляет собой C<sub>1-6</sub>алкил, такой как метил. Такие нуклеозиды LNA известны как N-замещенные LNA и раскрыты в международной заявке WO2008/150729. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бирадикал -X-Y- вместе обозначает двухвалентную линкерную группу -O-NR<sup>a</sup>-CH<sub>3</sub>- (Seth et al., 2010, J. Org. Chem). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бирадикал -X-Y- представляет собой -N(R<sup>a</sup>)-, W представляет собой O, и все из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> представляют собой водород. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления R<sup>a</sup> представляет собой C<sub>1-6</sub>алкил, такой как метил. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или оба из R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> представляют собой водород, и, если он замещен, другой R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> представляет собой C<sub>1-6</sub>алкил, такой как метил. В таком варианте осуществления все из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> могут представлять собой водород, и бирадикал -X-Y- может быть выбран из -O-CH<sub>2</sub>- или -O-CH(CR<sup>a</sup>)-, как например, из -O-CH(CH<sub>3</sub>)-.

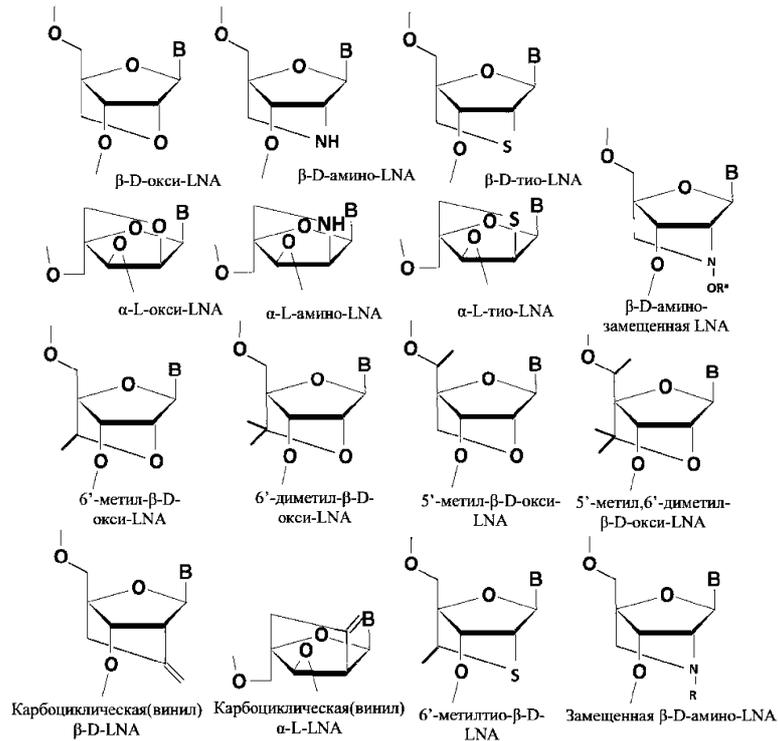
В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бирадикал представляет собой -CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-O-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-, такой как CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, W представляет собой O, и все из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> представляют собой водород. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления R<sup>a</sup> представляет собой C<sub>1-6</sub>алкил, такой как метил. Такие нуклеозиды LNA также известны как конформационно ограниченные нуклеотиды (CRN) и раскрыты в международной заявке WO2013036868.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бирадикал представляет собой -O-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-O-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-, такой как O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, W представляет собой O, и все из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>5\*</sup> представляют собой водород. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления R<sup>a</sup> представляет собой C<sub>1-6</sub>алкил, такой как метил. Такие нуклеозиды LNA также известны как СОС нуклеотиды и раскрыты в Mitsuoka et al., Nucleic Acids Research 2009 37(4), 1225-1238.

Будет понятно, что в случае, когда это не определено, нуклеозиды LNA могут присутствовать в бета-D или альфа-L стереоизоформе.

Определенные примеры нуклеозидов LNA представлены на схеме 1.

Схема 1



Как проиллюстрировано в примерах, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия нуклеозиды LNA в олигонуклеотидах представляют собой нуклеозиды бета-D-окси-LNA.

#### II.E. Опосредуемая нуклеазой деградация.

Опосредуемая нуклеазой деградация относится к олигонуклеотиду, способному опосредовать деградацию комплементарной нуклеотидной последовательности при образовании дуплекса с такой последовательностью.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления олигонуклеотид может функционировать посредством опосредуемой нуклеазой деградации нуклеиновой кислоты-мишени, при котором олигонуклеотиды согласно настоящему раскрытию способны привлекать нуклеазу, в особенности, эндонуклеазу, предпочтительно, эндорибонуклеазу (РНКазу), такую как РНКазы H. Примерами схем олигонуклеотидов, которые функционируют посредством опосредованных нуклеазой механизмов, являются олигонуклеотиды, которые, как правило, содержат участок по меньшей мере из 5 или 6 нуклеозидов ДНК и фланкированы с одной стороны или с двух сторон усиливающими аффинность нуклеозидами, например, гзпмеры.

#### II.F. Активность и привлечение РНКазы H.

Активность в отношении РНКазы H у антисмыслового олигонуклеотида относится к его способности к привлечению РНКазы H, когда она находится в дуплексе с комплементарной молекулой РНК и индуцирует расщепление и последующую деградацию комплементарной молекулы РНК. В международной заявке WO01/23613 представлены *in vitro* способы определения активности РНКазы H, которые можно применять для определения способности к привлечению РНКазы H. Как правило, олигонуклеотид считают способным к привлечению РНКазы H, если в случае, когда она обеспечена комплементарной последовательностью-мишенью нуклеиновой кислоты, она имеет начальную скорость, измеряемую в пмоль/л/мин, которая составляет по меньшей мере 5%, как например, по меньшей мере 10% или более чем 20% от начальной скорости, определенной при применении олигонуклеотида, имеющего такую же последовательность оснований, как модифицированный олигонуклеотид, подвергающийся тесту, но содержащий только мономеры ДНК с фосфоротиоатными мостиками между всеми мономерами в олигонуклеотиде, и с применением методики, обеспеченной в примерах 91-95 в международной заявке WO01/23613.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления олигонуклеотид считают, по существу, неспособным к привлечению РНКазы H, если в случае, когда она обеспечена комплементарной нуклеиновой кислотой-мишенью, начальная скорость для РНКазы H, измеряемая в пмоль/л/мин, составляет менее 20%, как например, менее 10%, как например, менее 5% от начальной скорости, определенной при применении олигонуклеотида, имеющего такую же последовательность оснований, но содержащего только мономеры ДНК без замещений по 2'-атому и с фосфоротиоатными мостиками между всеми мономерами в олигонуклеотиде, и с применением методики, представленной в примере 91-95 в междуна-

родной заявке WO01/23613.

II.G. Структура ASO.

ASO согласно настоящему раскрытию может содержать нуклеотидную последовательность, которая содержит как нуклеотиды, так и нуклеотидные аналоги, и могут присутствовать в форме гэнмера. Примеры конфигураций гэнмера, которые можно применять с ASO согласно настоящему раскрытию, описаны в публикации заявки на патент США № 2012/0322851.

Термин "гэнмер", используемый в контексте данного документа, относится к антисмысловому олигонуклеотиду, который содержит участок с привлекающими РНКазу Н олигонуклеотидами (гэн), который фланкирован с 5'- и 3'-конца одним или несколькими усиливающими аффинность модифицированными нуклеозидами (боковые части). Различные конструкции гэнмеров описаны в данном документе. Термин "гэнмер LNA" представляет собой олигонуклеотид гэнмера, в котором по меньшей мере один из усиливающих аффинность модифицированных нуклеозидов представляет собой нуклеозид LNA. Термин "гэнмер со смешанными крыльями" относится к гэнмеру LNA, в котором фланкирующие участки содержат по меньшей мере один нуклеозид LNA и по меньшей мере один нуклеозид ДНК или модифицированный нуклеозид, отличный от LNA, такой как по меньшей мере один 2'-замещенный модифицированный нуклеозид, такой как, например, нуклеозид(нуклеозиды) 2'-О-алкил-РНК, 2'-О-метил-РНК, 2'-алкокси-РНК, 2'-О-метоксиэтил-РНК (МОЕ), 2'-амино-ДНК, 2'-фтор-РНК и 2'-F-ANA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гэнмер со смешанными крыльями имеет один фланкирующий участок, который содержит нуклеозиды LNA (например, 5' или 3') и другой фланкирующий участок (3' или 5', соответственно) содержит 2'-замещенный(замещенные) модифицированный(модифицированные) нуклеозид (нуклеозиды).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления помимо усиления аффинности ASO в отношении участка-мишени, некоторые нуклеозидные аналоги также опосредуют связывание РНКазы и расщепление РНКазой (например, РНКазой Н).

II.G.1. Схема гэнмера.

В соответствии с одним вариантом осуществления ASO согласно настоящему раскрытию представляет собой гэнмер. ASO-гэнмер представляет собой ASO, который содержит непрерывный отрезок из нуклеотидов, который способен привлекать РНКазу, такую как РНКазу Н, как например, участок по меньшей мере из 6 нуклеотидов ДНК, называемый в данном документе участком В (В), причем участок В фланкирован со стороны как 5'-, так и 3'-конца участками с усиливающими аффинность нуклеотидными аналогами, как например, от 1-10 нуклеотидных аналогов со стороны как 5'-, так и 3'-конца относительно непрерывного отрезка нуклеотидов, который способен к привлечению РНКазы, - эти участки называются участками А (А) и С (С), соответственно.

В соответствии с определенными вариантами осуществления гэнмер представляет собой гэнмер с чередующимися нуклеотидами во фланкирующих участках, примеры которого обсуждаются ниже. В соответствии с определенными вариантами осуществления гэнмер с чередующимися нуклеотидами во фланкирующих участках проявляет меньшее нецелелевое связывание, нежели традиционный гэнмер. В соответствии с определенными вариантами осуществления гэнмер с чередующимися нуклеотидами во фланкирующих участках проявляет лучшую долговременную переносимость, нежели традиционный гэнмер.

Гэнмер с чередующимися нуклеотидами во фланкирующих участках может содержать последовательность (поли)нуклеотида формулы (от 5' к 3'), А-В-С, причем: участок А (А) (5' участок или последовательность первого крыла) содержит по меньшей мере один нуклеотидный аналог, как например, по меньшей мере одно звено LNA, как например, от 1-10 нуклеотидных аналогов, таких как звенья LNA, и участок В (В) содержит по меньшей мере шесть последовательных нуклеотидов, которые являются способными к привлечению РНКазы (при образовании дуплекса с комплементарной молекулой РНК, такой как пре-мРНК- или мРНК-мишень), таких как нуклеотиды ДНК, и участок С (С) (3' участок или последовательность второго крыла) содержит по меньшей мере один нуклеотидный аналог, такой как по меньшей мере одно звено LNA, как например, от 1-10 нуклеотидных аналогов, таких как звенья LNA; причем участки А и С могут включать в себя в любом положении в А и С 1-3 вставки участков из нуклеотидов ДНК (например, вставки ДНК), причем каждая из этих вставок ДНК может иметь длину 1-6 звеньев ДНК.

В соответствии с определенными другими вариантами осуществления гэнмер, например, гэнмер с чередующимися нуклеотидами во фланкирующих участках, содержит последовательность (поли)нуклеотида формулы (от 5' к 3'), А-В-С или, необязательно, А-В-С-D или D-А-В-С, причем: участок А (А) (5' участок) содержит по меньшей мере один нуклеотидный аналог, как например, по меньшей мере одно звено LNA, как например, от 1-10 нуклеотидных аналогов, таких как звенья LNA, и участок В (В) содержит по меньшей мере пять последовательных нуклеотидов, которые являются способными к привлечению РНКазы (при образовании дуплекса с комплементарной молекулой РНК, такой как мРНК-мишень), таких как нуклеотиды ДНК, и участок С (С) (3' участок) содержит по меньшей мере один нуклеотидный аналог, такой как по меньшей мере одно звено LNA, как например, от 1-10 нуклеотидных аналогов, таких как звенья LNA, и участок D (D), когда он присутствует, содержит 1, 2 или 3 нуклеотид-

ных звена, таких как нуклеотиды ДНК. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок А содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидных аналогов, таких как звенья LNA, как например, от 2-5 нуклеотидных аналогов, как например, 2-5 звеньев LNA, как например, 2-5 нуклеотидных аналогов, как например, 3-5 звеньев LNA; и/или участок С состоит из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидных аналогов, таких как звенья LNA, как например, от 2-5 нуклеотидных аналогов, как например, 2-5 звеньев LNA, как например, 2-5 нуклеотидных аналогов, как например, 3-5 звеньев LNA.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления В содержит 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 последовательных нуклеотидов, которые способны к привлечению РНКазы, или от 6-14, 7-14, 8-14, или от 7-10, или от 7-9, как например, 8, как например, 9, как например, 10, или, как например, 14 последовательных нуклеотидов, которые способны к привлечению РНКазы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок В содержит по меньшей мере пять нуклеотидных звеньев ДНК, как например, 5-23 звена ДНК, как например, от 5-20 звеньев ДНК, как например, от 5-18 звеньев ДНК, как например, от 6-14 звеньев ДНК, как например, от 8-14 звеньев ДНК, как например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 звеньев ДНК.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок А содержит 3, 4 или 5 нуклеотидных аналогов, таких как LNA, участок В состоит из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 звеньев ДНК, и участок С состоит из 3, 4 или 5 нуклеотидных аналогов, таких как LNA. Такие схемы включают в себя (А-В-С) 5-10-5, 3-14-3, 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 3-9-3, 3-9-4, 4-9-3, 3-8-3, 3-8-4, 4-8-3, 3-7-3, 3-7-4 и 4-7-3 и могут дополнительно включать в себя участок D, который может иметь от одного до 3 нуклеотидных звеньев, таких как звенья ДНК.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию, например, гзпмер с чередующимися нуклеотидами во фланкирующих участках, имеет формулу 5'-А-В-С-3', причем (i) участок В представляет собой непрерывную последовательность по меньшей мере из 5, 6, 7, 8, 9 или 10, например, 5-18 звеньев ДНК, которые способны к привлечению РНКазы; (ii) участок А представляет собой последовательность первого крыла из 1-10 нуклеотидов, причем последовательность первого крыла содержит один или несколько нуклеотидных аналогов и, необязательно, одно или несколько звеньев ДНК (например, вставку ДНК), и при этом по меньшей мере один из нуклеотидных аналогов расположен на 3'-конце А; и (iii) участок С представляет собой последовательность второго крыла из 1-10 нуклеотидов, причем последовательность второго крыла содержит один или несколько нуклеотидных аналогов и, необязательно, одно или несколько звеньев ДНК (например, вставку ДНК), и при этом по меньшей мере один из нуклеотидных аналогов расположен на 5'-конце С.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность первого крыла (участок А в формуле) содержит комбинацию нуклеотидных аналогов и звеньев ДНК, выбранных из (i) 1-10 нуклеотидных аналогов и 0 звеньев ДНК; (ii) 1-9 нуклеотидных аналогов и 1 звена ДНК; (iii) 1-8 нуклеотидных аналогов и 1-2 звеньев ДНК; (iv) 1-7 нуклеотидных аналогов и 1-3 звеньев ДНК; (v) 1-6 нуклеотидных аналогов и 1-4 звеньев ДНК; (vi) 1-5 нуклеотидных аналогов и 1-5 звеньев ДНК; (vii) 1-4 нуклеотидных аналогов и 1-6 звеньев ДНК; (viii) 1-3 нуклеотидных аналогов и 1-7 звеньев ДНК; (ix) 1-2 нуклеотидных аналогов и 1-8 звеньев ДНК; (x) 1 нуклеотидного аналога и 1-9 звеньев ДНК.

В соответствии с определенными вариантами осуществления последовательность второго крыла (участок С в формуле) содержит комбинацию нуклеотидных аналогов и звеньев ДНК, выбранных из (i) 1-10 нуклеотидных аналогов и 0 звеньев ДНК; (ii) 1-9 нуклеотидных аналогов и 1 звена ДНК; (iii) 1-8 нуклеотидных аналогов и 1-2 звеньев ДНК; (iv) 1-7 нуклеотидных аналогов и 1-3 звеньев ДНК; (v) 1-6 нуклеотидных аналогов и 1-4 звеньев ДНК; (vi) 1-5 нуклеотидных аналогов и 1-5 звеньев ДНК; (vii) 1-4 нуклеотидных аналогов и 1-6 звеньев ДНК; (viii) 1-3 нуклеотидных аналогов и 1-7 звеньев ДНК; (ix) 1-2 нуклеотидных аналогов и 1-8 звеньев ДНК; (x) 1 нуклеотидного аналога и 1-9 звеньев ДНК.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок А в формуле ASO имеет подформулу, выбранную из схемы первого крыла любых ASO на фиг. 2 и 3, и/или участок С в формуле ASO имеет подформулу, выбранную из структуры второго крыла любых ASO на фиг. 2 и 3, причем заглавная буква представляет собой нуклеотидный аналог (например, аналог с модифицированным сахаром, который также может быть записан как L), и строчная буква представляет собой ДНК (которая также может быть записана как D). В соответствии с определенными вариантами осуществления ASO, например, гзпмер с чередующимися нуклеотидами во фланкирующих участках, имеет формулу 5' А-В-С 3', причем участок В представляет собой непрерывную последовательность из 5-18 звеньев ДНК, участок А имеет формулу LLDLL, LDLLL или LLLDL, и участок С имеет формулу LLDLL или LDLDLL, и при этом L представляет собой звено LNA, и D представляет собой звено ДНК. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO имеет формулу 5' А-В-С 3', причем участок В представляет собой непрерывную последовательность из 10 звеньев ДНК, участок А имеет формулу LDL, и участок С имеет формулу LLLL, причем L представляет собой звено LNA, и D представляет собой звено DNA.

Дополнительные схемы гзпмеров раскрыты в международной заявке WO2004/046160, которая тем самым включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Международная заявка WO2008/113832 тем самым включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, относится к ASO-гзпмерам в виде коротких олигонуклеотидов ("шортмерам"). В соответствии с некото-

рыми вариантами осуществления ASO, представленные в данном документе, могут представлять собой такие гэммеры-шортмеры. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO, например, гэммер с чередующимися нуклеотидами во фланкирующих участках, содержит непрерывную нуклеотидную последовательность суммарно из 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидных единиц, причем непрерывная нуклеотидная последовательность имеет формулу (5'-3'), A-B-C или, необязательно, A-B-C-D или D-A-B-C, причем участок A состоит из 1, 2, 3, 4 или 5 звеньев нуклеотидных аналогов, таких как звенья LNA; участок B состоит из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 смежных нуклеотидных звеньев, которые способны к привлечению РНКазы при образовании дуплекса с комплементарной молекулой РНК (такой как мРНК-мишень); и участок C состоит из 1, 2, 3, 4 или 5 звеньев нуклеотидных аналогов, таких как звенья LNA. Если он присутствует, участок D состоит из одного звена ДНК. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления A содержит 1 звено LNA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок A содержит 2 звена LNA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок A содержит 3 звена LNA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок A содержит 4 звена LNA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок A содержит 5 звеньев LNA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок C содержит 1 звено LNA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления C содержит 2 звена LNA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок C содержит 3 звена LNA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок C содержит 4 звена LNA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок C содержит 5 звеньев LNA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок B содержит 6 нуклеотидных звеньев. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок B содержит 7 нуклеотидных звеньев. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок B содержит 8 нуклеотидных звеньев. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок B содержит 9 нуклеотидных звеньев. В соответствии с определенными вариантами осуществления участок B содержит 10 нуклеозидных звеньев. В соответствии с определенными вариантами осуществления участок B содержит 11 нуклеозидных звеньев. В соответствии с определенными вариантами осуществления участок B содержит 12 нуклеозидных звеньев. В соответствии с определенными вариантами осуществления участок B содержит 13 нуклеозидных звеньев. В соответствии с определенными вариантами осуществления участок B содержит 14 нуклеозидных звеньев. В соответствии с определенными вариантами осуществления участок B содержит 7-23 мономеров ДНК или 5-18 мономеров ДНК. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок B содержит от 6-23 звеньев ДНК, как например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 звена ДНК. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок B состоит из звеньев ДНК. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок B содержит по меньшей мере одно звено LNA, которое находится в альфа-L-конфигурации, как например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 звена LNA в альфа-L-конфигурации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок B содержит по меньшей мере одно звено альфа-L-окси-LNA, или при этом все звенья LNA в альфа-L-конфигурации представляют собой звенья альфа-L-окси-LNA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления число нуклеотидов, присутствующих в A-B-C, является выбранным из (звенья нуклеотидных аналогов - участок B - звенья нуклеотидных аналогов): 1-8-1, 1-8-2, 2-8-1, 2-8-2, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2, 4-8-1, 4-8-2, 1-8-4, 2-8-4, или 1-9-1, 1-9-2, 2-9-1, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 1-9-3, 3-9-1, 4-9-1, 1-9-4, или 1-10-1, 1-10-2, 2-10-1, 2-10-2, 1-10-3 и 3-10-1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления число нуклеотидов в A-B-C является выбранным из: 2-7-1, 1-7-2, 2-7-2, 3-7-3, 2-7-3, 3-7-2, 3-7-4 и 4-7-3. В соответствии с другими вариантами осуществления ASO содержит 10 звеньев ДНК в B, LDLLL в A (первое крыло) и LLDLL в C (второе крыло). В соответствии с другими вариантами осуществления ASO содержит 9 звеньев ДНК в B, LDDLL в A и LDLDLL в C. В соответствии с другими вариантами осуществления ASO содержит 10 звеньев ДНК в B, LLDLL в A и LLDLL в C. В соответствии с дополнительными вариантами осуществления ASO содержит 9 звеньев ДНК в B, LLLLL в A и LDDLL в C. В соответствии с определенными вариантами осуществления каждый из участков A и C содержит три мономера LNA, и участок B состоит из 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 мономеров-нуклеозидов, например, мономеров ДНК. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждый из A и C состоит из двух звеньев LNA, и B состоит из 7, 8 или 9 нуклеотидных звеньев, например, звеньев ДНК. В соответствии с различными вариантами осуществления другие схемы гэммеров включают в себя те, в которых участки A и/или C состоят из 3, 4, 5 или 6 нуклеозидных аналогов, таких как мономеры, содержащие 2'-О-метоксиэтил-рибозный сахар (2'-МОЕ), или мономеры, содержащие 2'-фтор-дезоксирибозный сахар, и участок B состоит из 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеозидов, таких как мономеры ДНК, причем участки A-B-C имеют 3-8-3, 3-9-3, 3-10-3, 5-10-5 или 4-12-4 мономера. Дополнительные схемы гэммеров раскрыты в международной заявке WO 2007/146511A2, которая тем самым включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO с чередующимися нуклеотидами во фланкирующих участках имеет по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов, содержащих участок A, участок B и участок C (A-B-C), причем участок B содержит по меньшей мере 5 смежных нуклеозидных звеньев и фланкирован на 5'-конце участком A из 1-8 смежных нуклеозидных звеньев и на 3'-конце участ-





1-1-1-10-4, 1-2-1-9-2-1-2, 1-2-1-9-1-1-3, 2-3-2-8-2, 1-1-2-1-1-9-2, 3-10-1-1-2, 3-9-1-2-2, 3-8-1-3-2, 3-8-1-1-1-1-2, 3-1-1-9-3, 3-1-1-8-1-1-2, 4-9-1-1-2, 4-8-1-2-2, 3-3-1-8-2, 3-2-1-9-2, 3-2-2-8-2, 3-2-2-7-3, 5-7-1-2-2, 1-1-3-10-2, 1-1-3-7-1-2-2, 1-1-4-9-2, 2-1-3-9-2, 3-1-1-10-2, 3-1-1-7-1-2-2, 3-1-2-9-2, 4-7-1-3-2, 5-9-1-1-2, 4-10-1-1-2, 3-11-1-1-2, 2-1-1-10-1-1-2, 1-1-3-9-1-1-2, 3-10-1-2-2, 3-9-1-3-2, 3-8-1-1-1-2-2, 4-9-1-2-2, 4-9-1-1-3, 4-8-1-3-2, 4-8-1-2-3, 4-8-1-1-1-1-2, 4-7-1-2-1-1-2, 4-7-1-1-1-2-2, 2-1-2-11-2, 2-1-3-8-1-1-2, 3-1-1-11-2, 3-1-1-9-1-1-2, 3-1-1-8-1-2-2, 3-1-1-7-1-1-1-1-2, 4-9-2-1-2, 4-7-1-3-3, 5-9-1-1-3, 5-9-1-2-2, 4-10-2-1-2, 4-10-1-1-3, 4-10-1-2-2, 3-11-2-1-2, 3-11-1-1-3, 5-9-2-1-2, 3-11-1-2-2, 2-1-2-9-1-2-2, 3-1-1-10-1-1-2, 3-1-1-9-1-2-2, 4-9-1-1-1-1-2, 4-8-2-1-1-1-2, 1-1-3-10-2-1-2, 2-1-2-10-2-1-2, 2-1-1-12-4, 2-2-1-11-4, 3-1-1-11-4, 2-1-1-13-3, 2-1-2-11-4, 2-2-1-12-3, 3-11-1-2-3, 3-1-1-12-3, 2-1-2-12-3, 4-11-2-1-2, 4-10-2-2-2, 3-2-1-9-1-1-3, 2-2-1-1-1-9-4, 2-2-2-9-1-1-3, 3-1-1-9-1-1-1-1-2, 2-1-2-9-1-2-3, 3-1-1-10-1-1-3, 2-1-1-2-1-9-4, 4-9-1-1-1-2-2, 3-1-1-9-1-2-3, 2-1-1-1-1-10-4, 2-1-2-10-1-1-3, 2-1-1-1-1-9-2-1-2, 2-2-2-9-2-1-2, 4-9-1-2-1-1-2, 3-2-1-9-2-1-2, 2-1-2-9-2-2-2, 2-1-1-1-1-9-1-1-3, 3-1-1-9-2-2-2, 2-2-2-10-4, 2-1-2-9-1-1-1-1-2, 4-10-1-2-3, 3-2-1-10-4, 3-1-1-10-2-1-2, 4-10-1-1-1-1-2, 4-11-1-1-3 и 2-2-2-10-1-1-2;

цифра представляет собой количество звеньев LNA, следующая - количество звеньев ДНК, и после нее участки чередующихся LNA и ДНК.

В соответствии с другими вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию представлены в виде любого из номеров ASO, выбранных из фиг. 2 и 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию (т.е. ASO-005459) содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной 17 нуклеотидов, которая соответствует комплементарной последовательности участка (т.е. соединения между интроном 1 и экзоном 2) в транскрипте SNCA, т.е. нуклеотиды 7604-7620 в SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию имеет нуклеотидную последовательность, которая изложена в SEQ ID NO: 15 (т.е. attcctttacaccacac) со схемой ASO LDLDDDDDDDDDDLLLL (т.е. AtTcctttacaccACAC), причем L обозначает нуклеозид закрытой нуклеиновой кислоты (т.е. LNA, например, бета-D-окси-LNA), и D обозначает дезоксирибонуклеиновую кислоту (DNA). Соответственно, 1<sup>й</sup>, 3<sup>й</sup> и 14<sup>й</sup>-17<sup>й</sup> нуклеотиды с 5'-конца ASO-005459 представляют собой бета-D-окси-LNA, и каждый из других нуклеотидов представляет собой ДНК. В соответствии с другими вариантами осуществления ASO, раскрытый в данном документе, также имеет следующую химическую структуру: OxyAs DNAts OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC, причем "s" обозначает фосфоротиоатный мостик. Структурная формула для ASO-005459 представлена на фиг. 21B, причем M<sup>+</sup> представляет собой фармацевтически приемлемый противоион. Термин "фармацевтически приемлемый противоион", используемый в контексте данного документа, относится к иону, который дополняет ионные частицы для того, чтобы поддерживать электронейтральность, который не является нежелательным с биологической или иной точки зрения и, благодаря этому, обеспечивает возможность получения фармацевтически приемлемой солевой формы. Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтически приемлемый противоион может представлять собой H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> или любой другой катион, например, катион с зарядом 1<sup>+</sup>. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтически приемлемый противоион представляет собой H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> или их комбинации.

#### II.H. Межнуклеотидные мостики.

Мономеры ASO описанных в данном документе соединены вместе посредством мостиковых групп. Соответственно, каждый мономер связан с 3'-смежным мономером через мостиковую группу.

Квалифицированный специалист в данной области техники поймет, что в контексте настоящего раскрытия 5'-мономер на конце ASO не содержит 5' мостиковую группу, хотя он может содержать или не содержать 5'-концевую группу.

Предполагается, что термины "мостиковая группа" и "межнуклеотидный мостик" означают группу, способную ковалентно связывать вместе два нуклеотида. Конкретные и предпочтительные примеры включают в себя фосфатные группы и фосфоротиоатные группы.

Нуклеотиды в ASO согласно настоящему раскрытию или последовательности смежных нуклеотидов в нем соединены вместе через мостиковые группы. Соответственно, каждый нуклеотид связан с 3'-смежным нуклеотидом через мостиковую группу.

Подходящие межнуклеотидные мостики включают в себя представленные в международной заявке WO2007/031091, например, межнуклеотидные мостики, представленные в первом абзаце на странице в международной заявке WO2007/031091 (включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Примеры подходящих межнуклеотидных мостиков, которые можно применять с настоящим раскрытием, включают в себя фосфодизфирный мостик, фосфотриэфирный мостик, метилфосфонатный мостик, фосфорамидатный мостик, фосфоротиоатный мостик и их комбинации.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предпочтительной является модификация межнуклеотидного мостика из нормального фосфодизфирного в такой, который является более устойчивым к атаке нуклеаз, такой как фосфоротиоатный или боранофосфатный - эти два, будучи расщепляемыми РНКазой H, также обеспечивают возможность этого пути антисмыслового ингибирования в снижении экспрессии целевого гена.

Подходящие содержащие серу (S) межнуклеотидные мостики, которые представлены в данном документе, могут быть предпочтительными. Фосфоротиоатные межнуклеотидные мостики также являются предпочтительными, в частности, для участка гэта (B) в гэтмерах.

Фосфоротиоатные мостики также можно применять для фланкирующих участков (A и C, а также для связывания A или C с D, и в пределах участка D при необходимости).

Участки A, B и C, тем не менее, могут содержать межнуклеотидные мостики, отличные от фосфоротиоатного, такие как фосфодизфирные мостики, в частности, например, когда применение нуклеотидных аналогов защищает межнуклеотидные мостики в пределах участков A и C от деградации под действием эндонуклеаз, как например, когда участки A и C содержат нуклеотиды LNA.

Межнуклеотидные мостики в ASO могут быть фосфодизфирными, фосфоротиоатными или боранофосфатными с тем, чтобы обеспечивать возможность расщепления РНКазой H РНК-мишени. Фосфоротиоат является предпочтительным из-за улучшенной устойчивости к нуклеазам и по другим причинам, таким как простота производства. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления межнуклеотидные мостики содержат один или несколько определяемых стереохимической структурой межнуклеотидных мостиков (например, таких как определяемые стереохимической структурой модифицированные фосфатные мостики, например, фосфодизфирные, фосфоротиоатные или боранофосфатные мостики с определенной стереохимической структурой). Термин "определяемый стереохимической структурой межнуклеотидный мостик" используется взаимозаменяемо с термином "хирально контролируемый межнуклеотидный мостик" и относится к межнуклеотидному мостику, в котором стереохимическое положение атома фосфора контролируется таким образом, что в пределах цепи ASO присутствует конкретное количество  $R_p$  или  $S_p$  в межнуклеотидном мостике. Стереохимическое положение хирального мостика можно определять (контролировать), например, с помощью асимметричного синтеза. ASO, имеющий по меньшей мере один определяемый стереохимической структурой межнуклеотидный мостик, может называться определяемым стереохимической структурой ASO, который включает в себя как полностью определяемый стереохимической структурой ASO, так и частично определяемый стереохимической структурой ASO.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO является полностью определяемым стереохимической структурой. Полностью определяемый стереохимической структурой ASO относится к последовательности ASO, имеющей определенный хиральный центр ( $R_p$  или  $S_p$ ) в каждом межнуклеотидном мостике в ASO. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO является частично определяемым стереохимической структурой. Частично определяемый стереохимической структурой ASO относится к последовательности ASO, имеющей определенный хиральный центр ( $R_p$  или  $S_p$ ) по меньшей мере в одном межнуклеотидном мостике, но не во всех из межнуклеотидных мостиков. Таким образом, частично определяемый стереохимической структурой ASO может включать в себя мостики, которые являются ахиральными или не определяемыми стереохимической структурой, дополнительно по меньшей мере к одному определяемому стереохимической структурой мостику. Если межнуклеотидный мостик в ASO является определяемым стереохимической структурой, желаемая конфигурация, либо  $R_p$ , либо  $S_p$ , присутствует по меньшей мере в 10%, по меньшей мере в 20%, по меньшей мере в 30%, по меньшей мере в 40%, по меньшей мере в 50%, по меньшей мере в 55%, по меньшей мере в 60%, по меньшей мере в 65%, по меньшей мере в 70%, по меньшей мере в 75%, по меньшей мере в 80%, по меньшей мере в 85%, по меньшей мере в 90%, по меньшей мере в 91%, по меньшей мере в 92%, по меньшей мере в 93%, по меньшей мере в 94%, по меньшей мере в 95%, по меньшей мере в 96%, по меньшей мере в 97%, по меньшей мере в 98%, по меньшей мере в 99% или, по существу, в 100% ASO.

В соответствии с одним аспектом ASO согласно настоящему раскрытию нуклеотиды и/или нуклеотидные аналоги связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных групп. Понятно, что включение фосфодизфирных мостиков, как например, одного или двух мостиков, в ASO, в котором все остальные мостики являются фосфоротиоатными, в особенности, между звеньями нуклеотидных аналогов или смежно с ними (как правило, в участке A и/или C) может модифицировать биологическую доступность ASO и/или распределение ASO в биологических системах - см. международную заявку WO2008/113832, включенную в данный документ посредством ссылки.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, такими как варианты осуществления, упомянутые выше, в случае, когда это является подходящим и не указано специально, все остальные мостиковые группы являются либо фосфодизфирными, либо фосфоротиоатными или являются их смесью.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления все межнуклеотидные мостиковые груп-

пы представляют собой фосфоротиоат.

Применительно к конкретным последовательностям олигонуклеотидов-гэпмеров, таким как представленные в данном документе, будет понятно, что в соответствии с различными вариантами осуществления в случае, когда мостики представляют собой фосфоротиоатные мостики, могут быть применены альтернативные мостики, такие как раскрытые в данном документе, например, можно применять фосфатные (фосфодиэфирные) мостики, в особенности, в случае мостиков между звеньями нуклеотидных аналогов, таких как LNA. Аналогично, применительно к конкретным последовательностям олигонуклеотидов-гэпмеров, таких как представленные в данном документе, в случае, когда остатки С аннотированы как 5'-метил-модифицированный цитозин, в соответствии с различными вариантами осуществления один или несколько С, присутствующих в ASO, могут представлять собой немодифицированные остатки С.

Публикация патентного документа США № 2011/0130441, который был опубликован 2 июня 2011 года и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, относится к соединениям-ASO, имеющим по меньшей мере один бициклический нуклеозид, прикрепленный к 3'- или 5'-концам посредством нейтрального межнуклеозидного мостика. Таким образом, ASO согласно настоящему раскрытию могут иметь по меньшей мере один бициклический нуклеозид, прикрепленный к 3'- или 5'-концам посредством нейтрального межнуклеозидного мостика, такого как один или несколько из фосфотриэфира, метилфосфоната, MMI (3'-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-5'), амид-3 (3'-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(H)-5'), формацетала (3'-O-CH<sub>2</sub>-O-5') или тиоформацетала (3'-S-CH<sub>2</sub>-O-5'). Остальные мостики могут представлять собой фосфоротиоат.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию имеют межнуклеотидные мостики, описанные на фиг. 2 и 3. В контексте данного документа, например, на фиг. 2 и 3, фосфоротиоатные мостики обозначены "s", а фосфодиэфирные мостики обозначены отсутствием "s".

#### II.I. Конъюгаты.

Термин "конъюгат", используемый в контексте данного документа, относится к олигонуклеотиду, который является ковалентно связанным с нуклеотидным фрагментом (конъюгируемым фрагментом, или участком С, или третьим участком).

Конъюгирование олигонуклеотида согласно настоящему раскрытию с одним или несколькими нуклеотидными фрагментами может улучшать фармакологические свойства олигонуклеотида, например, воздействуя на активность, распределение в клетках, поглощение в клетки или стабильность олигонуклеотида. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конъюгируемый фрагмент модифицирует или улучшает фармакокинетические свойства олигонуклеотида, улучшая распределение в клетках, биологическую доступность, метаболизм, выведение, проницаемость и/или поглощение олигонуклеотида в клетки. В частности, конъюгат может нацеливать олигонуклеотид на конкретный орган, ткань или тип клеток и тем самым повышать эффективность олигонуклеотида в этом органе, ткани или типе клеток. В то же время конъюгат может служить для снижения активности олигонуклеотида в нецелевых типах клеток, тканях или органах, например, нецелевой активности или активности в нецелевых типах клеток, тканях или органах. В международных заявках WO 93/07883 и WO2013/033230 представлены подходящие конъюгируемые фрагменты. Дополнительными подходящими конъюгируемыми фрагментами являются те, которые способны к связыванию с асиалогликопротеиновым рецептором (ASGPr). В частности, трехвалентные N-ацетилгалактозаминовые конъюгируемые фрагменты являются подходящими для связывания с ASGPr, см., например, международные заявки WO 2014/076196, WO 2014/207232 и WO 2014/179620.

Олигонуклеотидные конъюгаты и их синтез также были описаны в исчерпывающих обзорах в Manoharan in Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications, ST. Crooke, ed., Ch. 16, Marcel Dekker, Inc., 2001; и Manoharan, Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 2002, 12, 103.

В соответствии с вариантом осуществления нуклеотидный фрагмент (конъюгируемый фрагмент) является выбранным из группы, состоящей из углеводов, лигандов рецепторов клеточной поверхности, лекарственных веществ, гормонов, липофильных веществ, полимеров, белков, пептидов, токсинов (например, бактериальных токсинов), витаминов, вирусных белков (например, капсидов) и их комбинаций.

#### II.J. Активированные ASO.

Термин "активированный ASO", используемый в контексте данного документа, относится к ASO согласно настоящему раскрытию, который является ковалентно связанным (т.е. функционализированным) по меньшей мере с одним функциональным фрагментом, который позволяет образование ковалентной связи ASO с одним или несколькими конъюгированными фрагментами, т.е. фрагментами, которые сами не являются нуклеиновыми кислотами или мономерами, с образованием конъюгатов, описанных в данном документе. Как правило, функциональный фрагмент будет содержать химическую группу, которая способна ковалентно связываться с ASO, например, через 3'-гидроксильную группу или экзотрициклическую NH<sub>2</sub>-группу в адениновом основании, спейсер, который может быть гидрофильным, и концевую группу, которая способна связываться с конъюгируемым фрагментом (например, амино, сульфгидрильную или гидроксильную группу). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления эта концевая группа не является защищенной, например, представляет собой NH<sub>2</sub>-группу. В соответствии с

другими вариантами осуществления концевая группа является защищенной, например, с помощью любой подходящей защитной группы, такой как защитные группы, описанные в "Protective Groups in Organic Synthesis" за авторством Theodora W Greene and Peter GM Wuts, 3rd edition (John Wiley & Sons, 1999).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию являются функционализированными на 5'-конце для того, чтобы обеспечивать возможность ковалентного присоединения конъюгируемого фрагмента к 5'-концу ASO. В соответствии с другими вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию могут быть функционализированными на 3'-конце. В соответствии с другими вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию могут быть функционализированными вдоль остова или по фрагменту гетероциклического основания. В соответствии с другими вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию могут быть функционализированными в более чем одном положении, независимо выбранном из 5'-конца, 3'-конца, остова и основания.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления активированные ASO согласно настоящему раскрытию синтезируют посредством включения в ходе синтеза одного или нескольких мономеров, которые ковалентно присоединены к функциональному фрагменту. В соответствии с другими вариантами осуществления активированные ASO согласно настоящему раскрытию синтезируют с использованием мономеров, которые не были функционализированы, и ASO функционализируют по завершению синтеза.

### III. Фармацевтические композиции и пути введения.

ASO согласно настоящему раскрытию можно применять в фармацевтических составах и композициях. Соответственно, такие композиции содержат фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, соль или вспомогательное средство.

ASO согласно настоящему раскрытию могут быть включены в стандартный состав, как например, в фармацевтически приемлемом носителе или разбавителе, в количестве, достаточном для того, чтобы доставить пациенту терапевтически эффективное количество, не вызывая серьезных побочных эффектов у пациента, получающего лечение. Тем не менее, при некоторых формах терапии серьезные побочные эффекты могут быть приемлемыми с точки зрения обеспечения положительного результата терапевтического лечения. Составленное лекарственное средство может содержать фармацевтически приемлемые связующие средства и вспомогательные средства. Капсулы, таблетки или пилюли могут содержать, например, следующие следующие соединения: микрокристаллическую целлюлозу, камедь или желатин в качестве связующих; крахмал или лактозу в качестве вспомогательных веществ; стеараты в качестве смазывающих веществ; различные подсластители или ароматизирующие средства. В случае капсул дозируемая единица может содержать жидкий носитель, подобный жирным маслам. Аналогично, покрытия из сахара или кишечнорастворимые покрытия могут составлять часть дозируемой единицы.

Составы с олигонуклеотидом также могут представлять собой эмульсии активных фармацевтических ингредиентов и липида, образующего мицеллярную эмульсию.

Фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию можно вводить различными способами в зависимости от того, является ли желательным локальное или системное лечение, и от области, подлежащей лечению. Введение может представлять собой (a) пероральное, (b) легочное, например, посредством ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, в том числе с помощью небулайзера; интратрахеальное, интраназальное, (c) местное, в том числе эпидермальное, трансдермальное, глазное и на слизистые оболочки, в том числе вагинальную и ректальную доставку; или (d) парентеральное введение, в том числе внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию; или внутричерепное введение, например, интратекальное, интрацеребровентрикулярное или интравентрикулярное введение. В соответствии с одним вариантом осуществления ASO вводят IV, IP, перорально, местно или в виде струйной инъекции или вводят непосредственно в целевой орган. В соответствии с еще одним вариантом осуществления ASO вводят интратекально или интрацеребровентрикулярно в виде струйной инъекции.

Фармацевтические композиции и составы для местного введения могут включать в себя трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, распыляемые растворы, суппозитории, жидкости и порошки. Необходимыми или желательными могут быть традиционные фармацевтические носители, водные, порошковые или масляные основы, загустители и т.п. Примеры составов для местного введения включают в себя те, в которых ASO согласно настоящему раскрытию присутствуют в смеси со средством для местной доставки, таким как липиды, липосомы, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, стероиды, хелатирующие средства и поверхностно-активные вещества. Композиции и составы для перорального введения включают в себя, без ограничения, порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводной среде, капсулы, мягкие гелевые капсулы, саше, таблетки или минитаблетки. Композиции и составы для парентерального, интратекального, интрацеребровентрикулярного или интравентрикулярного введения могут включать в себя стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки, такие как, без ограничения, вещества, способствующие проникновению, соединения-носители и другие фармацев-

тически приемлемые носители или вспомогательные вещества.

Фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию включают в себя, без ограничения, растворы, эмульсии и составы, содержащие липосомы. Эти композиции могут быть образованы из ряда компонентов, которые включают в себя, без ограничения, подготовленные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полужидкие вещества. Доставку лекарственного средства в целевую ткань можно улучшить с помощью опосредуемой носителем доставки, в том числе, без ограничения, катионных липосом, циклодекстринов, производных порфирина, разветвленных дендримеров, полиэтилениминовых полимеров, наночастиц и микросфер (Dass CR. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54(1): 3-27).

Фармацевтические составы согласно настоящему раскрытию, которые в целях удобства могут присутствовать в единичной лекарственной форме, можно получить в соответствии с традиционными методиками, хорошо известными в фармацевтической промышленности. Такие методики включают стадию объединения активных ингредиентов с фармацевтическим(фармацевтическими) носителем(носителями) или вспомогательным(вспомогательными) веществом(веществами). Обычно составы готовят посредством равномерного и тщательного объединения активных ингредиентов с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями или обоими из них, а затем, если необходимо, придания продукту определенной формы.

В случае парентерального, подкожного, интрадермального или местного введения состав может включать в себя стерильный разбавитель, буферы, регуляторы тоничности и антибактериальные средства. Активные ASO можно приготовить с носителями, которые защищают от разрушения или немедленного удаления из организма, в том числе в виде имплантатов или микрокапсул со свойствами контролируемого высвобождения. В случае внутривенного введения носители могут представлять собой физиологический солевой раствор или фосфатно-солевой буферный раствор. В публикации международной заявки № WO2007/031091 (A2), опубликованной 22 марта 2007 года, дополнительно представлены подходящие фармацевтически приемлемые разбавитель, носитель и вспомогательные средства, которые тем самым включены в данный документ посредством ссылки.

#### IV. Диагностика.

Настоящим раскрытием дополнительно предусмотрен диагностический способ, пригодный при диагностике связанных с SNCA заболеваний, например, синуклеопатии. Неограничивающие примеры синуклеопатии включают в себя, без ограничения, болезнь Паркинсона, деменцию при болезни Паркинсона (PDD), деменцию с тельцами Леви и мультисистемную атрофию.

ASO согласно настоящему раскрытию можно применять для измерения экспрессии транскрипта SNCA в ткани или жидкости организма от индивида и сравнения измеренного уровня экспрессии со стандартным уровнем экспрессии транскрипта SNCA в нормальной ткани или жидкости организма, при этом повышение уровня экспрессии по сравнению со стандартом является показателем заболевания, поддающегося лечению с помощью ASO согласно настоящему раскрытию.

ASO согласно настоящему раскрытию можно применять для анализа уровней транскрипта SNCA в биологическом образце с применением любых способов, известных специалистам в данной области техники. (Touboul et al., *Anticancer Res.* (2002) 22 (6A): 3349-56; Verjout et al., *Mutat. Res.* (2000) 640: 127-38); Stowe et al., *J. Virol. Methods* (1998) 75 (1): 93-91).

Под "биологическим образцом" подразумевают любой биологический образец, полученный от индивида, клеточной линии, тканевой культуры или другого источника клеток, потенциально экспрессирующих транскрипт SNCA. Способы получения биоптатов тканей и жидкостей организма от млекопитающих являются хорошо известными в уровне техники.

#### V. Наборы, содержащие ASO.

Настоящим раскрытием дополнительно предусмотрены наборы, которые содержат ASO согласно настоящему раскрытию, описанный в данном документе, и которые можно применять для осуществления способов, описанных в данном документе. В соответствии с определенными вариантами осуществления набор содержит по меньшей мере один ASO в одном или нескольких контейнерах. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления наборы содержат все из компонентов, необходимых и/или достаточных для осуществления анализа для выявления, в том числе все контроли, указания по осуществлению анализов и любое необходимое программное обеспечение для анализа и представления результатов. Специалист в данной области техники легко поймет, что раскрытый ASO может быть легко включен в один из общепризнанных форматов набора, которые являются хорошо известными в уровне техники.

#### VI. Способы применения.

ASO согласно настоящему раскрытию можно применять для терапии и профилактики. SNCA представляет собой белок из 140 аминокислот, экспрессирующийся преимущественно в нейронах в пресинаптических терминалах, где он, как полагают, играет роль в регуляции синаптической передачи. Предполагали, что он существует изначально как в виде несвернутого мономера, так и стабильного тетрамера из  $\alpha$ -спиралей, и было показано, что он подвергается нескольким посттрансляционным модификациям. Одна модификация, которая широко изучалась, представляет собой фосфорилирование SNCA по аминокислоте серину 129 (S129). В норме только небольшой процент SNCA являются постоянно фосфорили-

рованными по S129 (pS129), в то время как подавляющее большинство SNCA, обнаруживаемого в патологических внутриклеточных включениях, представляет собой pS129 SNCA. Эти патологические включения состоят из агрегированных нерастворимых скоплений неправильно свернутых белков SNCA и являются характерным признаком группы нейродегенеративных заболеваний, известных в совокупности как синуклеопатии. При синуклеопатиях SNCA может образовывать патологические агрегаты в нейронах, известные как тельца Леви, которые являются характерными как для болезни Паркинсона (PD), деменции при болезни Паркинсона (PDD), так и деменции с тельцами Леви (DLB). Таким образом, ASO согласно настоящему изобретению могут снижать количество патологических агрегатов SNCA или предотвращать образование патологических агрегатов SNCA. Кроме того, аномальные богатые SNCA очаги, называемые глиальными цитоплазматическими включениями (GCI), обнаруживаются в олигодендроцитах и являются отличительным признаком быстро прогрессирующей смертельной синуклеопатии, известной как мультисистемная атрофия (MSA). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию снижают количество GCI или предотвращают образование GCI. Сообщения о либо не поддающихся выявлению, либо низких уровнях экспрессии мРНК SNCA в олигодендроцитах говорят о том, что некая патологическая форма SNCA распространяется из нейронов, где он экспрессируется на высоком уровне, в олигодендроциты. В соответствии с определенными вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию снижают или предотвращают распространение SNCA, например, патологической формы SNCA, из нейронов.

ASO можно применять в исследовании, например, для специфического ингибирования синтеза белка SNCA (как правило, посредством разрушения или ингибирования мРНК, и вследствие этого предотвращается образование белка) в клетках и экспериментальных животных, таким образом облегчая функциональный анализ мишени или давая оценку ее применимости в качестве мишени для терапевтического вмешательства. Дополнительно предусмотрены способы понижающей регуляции экспрессии мРНК SNCA и/или белка SNCA в клетках или тканях, предусматривающие обеспечение контакта клеток или тканей, *in vitro* или *in vivo*, с эффективным количеством одного или нескольких из ASO, конъюгатов или композиций согласно настоящему раскрытию.

В случае терапии животное или человек с подозрением на заболевание или нарушение, лечение которого можно осуществлять посредством модулирования экспрессии транскрипта SNCA и/или белка SNCA, получает лечение посредством введения соединений ASO в соответствии с настоящим раскрытием. Дополнительно предусмотрены способы лечения млекопитающего, как например, лечения человека, с подозрением на заболевание или состояние, ассоциированное с экспрессией транскрипта SNCA и/или белка SNCA, или предрасположенный к заболеванию или состоянию, ассоциированному с экспрессией транскрипта SNCA и/или белка SNCA, посредством введения терапевтически или профилактически эффективного количества одного или нескольких из ASO или композиций согласно настоящему раскрытию. ASO, конъюгат или фармацевтическую композицию согласно настоящему раскрытию, как правило, вводят в эффективном количестве. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO или конъюгат согласно настоящему раскрытию применяют в терапии.

Настоящим раскрытием дополнительно предусмотрен ASO согласно настоящему раскрытию для применения в лечении одного или нескольких из заболеваний, упомянутых в данном документе, таких как заболевание, выбранное из группы, состоящей из болезни Паркинсона, деменции при болезни Паркинсона (PDD), деменции с тельцами Леви, мультисистемной атрофии и любых их комбинаций.

Настоящим раскрытием дополнительно предусмотрен способ лечения  $\alpha$ -синуклеопатий, причем способ предусматривает введение эффективного количества одного или нескольких ASO, конъюгатов или их фармацевтических композиций животному, нуждающемуся в этом (как например, пациенту, нуждающемуся в этом).

В соответствии с определенными вариантами осуществления заболевание, нарушение или состояние является ассоциированным со сверхэкспрессией транскрипта гена SNCA и/или белка SNCA.

Настоящим раскрытием также предусмотрены способы ингибирования (например, посредством снижения) экспрессии транскрипта гена SNCA и/или белка SNCA в клетке или ткани, причем способ предусматривает обеспечение контакта клетки или ткани, *in vitro* или *in vivo*, с эффективным количеством одного или нескольких ASO, конъюгатов или их фармацевтических композиций согласно настоящему раскрытию для обеспечения нарушения экспрессии транскрипта гена SNCA, таким образом снижая уровень белка SNCA. В соответствии с определенными вариантами осуществления ASO применяют для снижения экспрессии мРНК SNCA в одном или нескольких отделах головного мозга, например, в гиппокампе, стволе головного мозга, полосатом теле или любых их комбинациях. В соответствии с другими вариантами осуществления ASO снижают экспрессию мРНК SNCA, например, в стволе головного мозга и/или полосатом теле, менее чем на 70%, менее чем на 60%, менее чем на 50%, менее чем на 40%, менее чем на 30%, менее чем на 20%, менее чем на 10% или менее чем на 5% по сравнению с экспрессией мРНК SNCA после введения или воздействия среды (без ASO) на 3 сутки, на 5 сутки, на 7 сутки, на 10 сутки, на 14 сутки, на 15 сутки, на 20 сутки, на 21 сутки или на 25 сутки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления экспрессия мРНК SNCA сохраняется на уровне ниже 70%, ниже 60%, ниже 50%, ниже 40%, ниже 30%, ниже 20%, ниже 10% или ниже 5% по сравнению с экспрессией мРНК SNCA

после введения или воздействия среды (без ASO) до 28 суток, до 30 суток, до 32 суток, до 35 суток, до 40 суток, до 42 суток, до 45 суток, до 49 суток, до 50 суток, до 56 суток, до 60 суток, до 63 суток, до 70 суток или до 75 суток.

В соответствии с другими вариантами осуществления ASO согласно настоящему раскрытию снижает экспрессию мРНК SNCA и/или белка SNCA в продолговатом мозге, дорсальном отделе полосатого тела, варолиевом мосту, мозжечке, поясничном отделе спинного мозга, лобной доле коры головного мозга и/или любых их комбинациях. Настоящим раскрытием также предусмотрено применение описанного ASO или конъюгата согласно настоящему раскрытию для производства лекарственного препарата. Настоящим раскрытием также предусмотрена композиция, содержащая ASO или его конъюгат, для применения в лечении нарушения, упомянутого в данном документе, или в способе лечения нарушения, упомянутого в данном документе. Настоящим раскрытием также предусмотрены ASO или конъюгаты для применения в терапии. Настоящим раскрытием дополнительно предусмотрены ASO или конъюгаты для применения в лечении синуклеопатии.

Настоящим раскрытием дополнительно предусмотрен способ ингибирования белка SNCA в клетке, которая экспрессирует SNCA, предусматривающий введение ASO или конъюгата согласно настоящему раскрытию в клетку для обеспечения ингибирования белка SNCA в клетке.

Настоящее раскрытие включает в себя способ снижения, ослабления, предупреждения или лечения чрезмерной возбудимости нейронов у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий введение ASO или конъюгата согласно настоящему раскрытию. Настоящим раскрытием также предусмотрен способ лечения нарушения, упомянутого в данном документе, причем способ предусматривает введение описанного в данном документе ASO или конъюгата согласно настоящему раскрытию и/или фармацевтической композиции согласно настоящему раскрытию пациенту, нуждающемуся в этом.

ASO и другие композиции согласно настоящему раскрытию можно применять для лечения состояний, ассоциированных со сверхэкспрессией или экспрессией мутированного варианта белка SNCA.

Настоящим раскрытием предусмотрен ASO или конъюгат согласно настоящему раскрытию для применения в качестве лекарственного препарата, как например, для лечения  $\alpha$ -синуклеопатий. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $\alpha$ -синуклеопатия представляет собой заболевание, выбранное из группы, состоящей из болезни Паркинсона, деменции при болезни Паркинсона (PDD), деменции с тельцами Леви, мультисистемной атрофии и любых их комбинаций.

Настоящим раскрытием дополнительно предусмотрено применение ASO согласно настоящему раскрытию в производстве лекарственного препарата для лечения заболевания, нарушения или состояния, упомянутого в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO или конъюгат согласно настоящему раскрытию применяют для производства лекарственного препарата для лечения  $\alpha$ -синуклеопатии, судорожного расстройства или их комбинации.

Как изложено в общих чертах, один аспект настоящего раскрытия направлен на способ лечения млекопитающего, страдающего от состояний, ассоциированных с аномальными уровнями SNCA (т.е.  $\alpha$ -синуклеопатии), или чувствительного к ним, который предусматривает введение млекопитающему терапевтически эффективного количества ASO, целенаправленно воздействующего на транскрипт SNCA, который содержит одно или несколько звеньев LNA. ASO, конъюгат или фармацевтическую композицию согласно настоящему раскрытию, как правило, вводят в эффективном количестве.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления заболевание или нарушение, упомянутое в данном документе, может быть ассоциировано с мутацией в гене SNCA или в гене, белок-продукт которого ассоциирован с белком SNCA или взаимодействует с ним. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления мРНК-мишень представляет собой мутированную форму последовательности SNCA.

Интересный аспект настоящего раскрытия направлен на применение ASO (соединения), который определен в данном документе, или конъюгата, который определен в данном документе, для получения лекарственного препарата для лечения заболевания, нарушения или состояния, упомянутого в данном документе.

Способы согласно настоящему раскрытию можно использовать для лечения или профилактики заболеваний, вызываемых аномальными уровнями белка SNCA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления заболевания, вызываемые аномальными уровнями белка SNCA, представляют собой  $\alpha$ -синуклеопатии. В соответствии с определенными вариантами осуществления  $\alpha$ -синуклеопатии включают в себя болезнь Паркинсона, деменцию при болезни Паркинсона (PDD), деменцию с тельцами Леви и мультисистемную атрофию. Как изложено в качестве альтернативы, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие дополнительно направлено на способ лечения аномальных уровней белка SNCA, причем способ предусматривает введение ASO согласно настоящему раскрытию, или конъюгата согласно настоящему раскрытию, или фармацевтической композиции согласно настоящему раскрытию пациенту, нуждающемуся в этом.

Настоящее раскрытие также относится к ASO, композиции или конъюгату, которые определены в данном документе, для применения в качестве лекарственного препарата. Настоящее раскрытие допол-

нительно относится к применению соединения, композиции или конъюгата, которые определены в данном документе, для производства лекарственного препарата для лечения аномальных уровней белка SNCA или экспрессии мутантных форм белка SNCA (таких как аллельные варианты, как например, ассоциированные с одним из заболеваний, упомянутых в данном документе).

Пациент, который нуждается в лечении, представляет собой пациента, страдающего или, вероятно, страдающего от заболевания или нарушения.

Если не указано иное, в практическом осуществлении настоящего раскрытия будут использоваться общепринятые методики клеточной биологии, культивирования клеток, молекулярной биологии, биологии трансгенных организмов, микробиологии, технологии рекомбинантной ДНК и иммунологии, которые находятся в рамках квалификации специалиста в данной области техники. Таким методикам дано полное объяснение в литературе. См., например, Sambrook et al., ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2<sup>nd</sup> ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning, Volumes I and II*; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; патент США № 4683195 за авторством Mullis и соавт.; Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., *Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155*; Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds. (1986) *Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV*; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); ); Crooke, *Antisense drug Technology: Principles, Strategies and Applications*, 2<sup>nd</sup> Ed. CRC Press (2007); и в Ausubel et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

Все из цитируемых выше источников, а также все источники, цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Следующие примеры представлены в качестве иллюстрации, а не с целью ограничения.

### Примеры

#### Пример 1. Конструирование ASO.

Антисмысловые олигонуклеотиды, описанные в данном документе, конструировали для целенаправленного воздействия на различные участки в пре-мРНК SNCA. См., фиг. 1А для геномной последовательности SNCA и фиг. 1В для кДНК SNCA. Например, ASO конструировали для целенаправленного воздействия на участки, обозначенные с использованием сайта начала пре-мРНК и сайта конца пре-мРНК для NG\_011851.1, как показано на фиг. 2, и/или сайта начала и сайта конца мРНК для его мРНК. Иллюстративные последовательности ASO (например, номера SEQ ID) описаны на фиг. 2 и 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ASO сконструированы таким образом, чтобы они имели структуру гэпмеров (например, гэпмеров с чередующимися звеньями). См. номера DES. На фиг. 2 и 3 представлены неограничивающие примеры схемы ASO для выбранных последовательностей. Такие же способы можно применять для любых других последовательностей, раскрытых в данном документе. Гэпмеры конструировали таким образом, чтобы они содержали закрытые нуклеиновые кислоты - LNA (заглавные буквы). Например, гэпмер может иметь бета-дезокси-LNA на 5'-конце и на 3'-конце и имеет фосфоротиоатный остов. Но LNA также могут быть заменены на любые другие нуклеотидные аналоги, и остов может представлять собой другие типы остовов (например, фосфодиэфирный мостик, фосфотриэфирный мостик, метилфосфонатный мостик, фосфорамидатный мостик или их комбинации).

ASO синтезировали с применением способов, хорошо известных в уровне техники. Иллюстративные способы получения таких ASO описаны в Barciszewski et al., в главе 10 - "Аптамеры закрытой нуклеиновой кислоты" ("Locked Nucleic Acid Aptamers") в *Nucleic Acid and Peptide Aptamers: Methods and Protocols*, vol. 535, Gunter Mayer (ed.) (2009), причем полное содержание этого документа специально включено в данный документ посредством ссылки.

Пример 2А. Анализ высокого содержания для измерения уменьшения уровня белка SNCA в первичных нейронах.

ASO, целенаправленно воздействующие на SNCA, исследовали в отношении их способности к снижению экспрессии белка SNCA в мышинных первичных нейронах. Культуры первичных нейронов получали из переднего мозга PAC-T g(SNCA<sup>A53T</sup>+/+; SNCA<sup>-/-</sup>) ("PAC-A53T") мышей, несущих полный ген человеческого SNCA с мутацией A53T на фоне нокаутного мышинового SNCA. См. Kuo Y et al., *Hum Mol Genet*, 19: 1633-50 (2010). Все процедуры, в которых были задействованы мыши, проводили в соответствии с методами испытаний на животных (*Animal Test Methods*) (ATM), одобренными Комитетом по уходу и использованию животных компании "Бристоль-Майерс Сквибб" (Bristol-Myers Squibb Animal Care and Use Committee) (ACUC). Первичные нейроны получали посредством расщепления папаином в соответствии с протоколом производителя (Worthington Biochemical Corporation, LK0031050). Выделенные нейроны промывали и ресуспендировали в нейробазальной среде (NBM, Invitrogen), дополненной B27 (Gibco), 1,25 мкМ Glutamax (Gibco), 100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 25 мкг/мл

амфотерицина В.

Клетки высевали на многолуночные покрытые поли-D-лизином планшеты в количестве 5400 клеток/см<sup>2</sup> (например, в 384-луночные планшеты по 6000 клеток/луночка в 25 мкл NBM). ASO разводили в воде и добавляли к клеткам в DIV01 (т.е. 1 сутки после посева). ASO добавляли в концентрации 2-кратно превышающей конечную концентрацию в среде, затем доставляли в клетки в ручном режиме. В качестве альтернативы, ASO в воде дозировали с применением акустического дозирующего устройства Labcyte ECHO. Для дозирования с помощью ECHO 250 нл ASO в воде добавляли к клеткам в среде с последующим добавлением равного аликвоте объема свежей аликвоты BM. Для первичного скрининга ASO добавляли в конечных концентрациях, составляющих 5 мкМ, 3,3 мкМ, 1 мкМ, 200 нМ или 40 нМ. Для определения активности 8-10 последовательно снижающихся концентраций ASO готовили из 0,75 мМ маточный раствор затем доставляли в культивируемые клетки с диапазоном конечных концентраций, составляющих 2,7-4000 нМ или 4,5-10000 нМ. ASO-000010 (TCTgtcttgctTTG, SEQ ID NO: 22) и ASO-000838 (AGAAataagtgtAGT, SEQ ID NO: 23) (5 мкМ) включали в каждый планшет в качестве эталонных контрольных ингибиторов для тубулина и SNCA, соответственно. Клетки инкубировали с ASO в течение 14 суток для достижения установившегося снижения уровня мРНК.

После 14 суток инкубирования клетки фиксировали посредством добавления фиксатора до конечных концентраций 4% формальдегида (J.T. Baker) и 4% сахарозы (Sigma) в лунки. Клетки фиксировали в течение 15 мин, а затем фиксатор отсасывали из лунок. Затем клетки пермеабелизировали в течение 20 мин с использованием фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), содержащего 0,3% Triton-X 100 и 3% бычьего сывороточного альбумина (BSA) или 3% нормальной козьей сыворотки. После этого буфер для пермеабелизации отсасывали из лунок и клетки промывали один раз PBS. Первичные антитела затем разводили в PBS, содержащем 0,1% Triton X-100 и 3% BSA. Использовали разведения 1:1000 кроличьего антитела к SNCA (Abcam) и 1:500 куриного антитела к тубулину (Abcam). Клетки инкубировали с первичными антителами от 2 ч до периода, продолжающегося всю ночь. После инкубирования раствор для окрашивания с первичным антителом отсасывали и клетки промывали 2 раза PBS. Раствор для окрашивания со вторичным антителом, содержащий конъюгированное с Alexa 567 козье антитело к куриному антителу, конъюгированное с Alexa 488 козье антитело к кроличьему антителу в разведении 1:500 и краситель Хехста (10 мкг/мл) в PBS, содержащем 0,1% Triton X-100 с 3% BSA, добавляли к клеткам и планшеты инкубировали в течение 1 ч. После этого раствор для окрашивания со вторичным антителом отсасывали из лунок и клетки промывали 3 раза PBS. После промывания клеток 60 мкл PBS добавляли в каждую лунку. Планшеты затем хранили в PBS до визуализации.

Для визуализации планшеты сканировали на приборе Thermo-Fisher (Cellomics) CX5 с использованием программного приложения Spot Detector bio-application (Cellomics) для количественного определения ядер (краситель Хехста, канал 1), включений тубулина (Alexa 567, канал 2) и SNCA (Alexa 488, канал 3). Подсчитанное количество объектов (ядра) отслеживали, но не публиковали в базе данных. Общую площадь, занятую тубулином, определяли в виде характеристики общей площади пятен для канала 2 (SpotTotalAreaCh2) и общую интенсивность окрашивания для SNCA определяли как общую интенсивность пятен для канала 3 (SpotTotalIntenCh3). Измерение тубулина включали для мониторинга токсичности. Для определения снижения уровня белка SNCA рассчитывали отношение интенсивности для SNCA к площади окрашенной области для тубулина и результаты нормализовали в виде выраженного в % медианного значения ингибирования с использованием медианного значения для обработанных средой лунок в качестве суммарной величины и лунок ASO-000010 или ASO-000838 в качестве лунок с максимальным ингибированием для тубулина или SNCA, соответственно.

Пример 2В. Измерение спонтанных колебаний уровней кальция.

Пониженные колебания внутриклеточной концентрации несвязанного кальция (колебания уровней кальция) соответствуют повышенной нейротоксичности, и, вследствие этого, они могут указывать на пониженную переносимость *in vivo*. Для измерения спонтанных колебаний уровней кальция в первичных нейронах коры головного мозга первичные нейроны коры головного мозга крысы получали из эмбрионов крыс линии Спраг-Доули (E19). Вкратце, кору головного мозга вырезали и инкубировали при 37°C в течение 30-45 мин в растворе с папаином/ДНКазой/сбалансированным солевым раствором Эрла (EBSS). После гомогенизации и центрифугирования клеточной массы реакцию останавливали посредством инкубирования с EBSS, содержащим ингибиторы протеазы, бычий сывороточный альбумин (BSA) и ДНКазу. Затем клетки гомогенизировали и промывали нейробазальной средой (NB, Invitrogen), дополненной 2% В-27, 100 мкг/мл пенициллина, 85 мкг/мл стрептомицина и 0,5 мМ глутамином.

Клетки высевали в концентрации, составляющей 25000 клеток/луночка, на покрытые поли-D-лизином 384-луночные планшеты для флуоресцентной визуализации (BD Biosciences) в объеме 25 мкл/луночка, дополненном нейробазальной (NB) средой (содержащей добавку В27 и 2 мМ глутамин). Клетки выращивали в течение 12 суток при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> и снабжали 25 мкл дополнительной среды в DIV04 (т.е. через 4 суток после посева) и DIV08 (т.е. через 8 суток после посева) для использования в DIV12 (т.е. через 12 суток после посева). В день проведения эксперимента среду NB удаляли из планшета и клетки промывали один раз буфером для анализа (сбалансированный солевой раствор Хенкса, содержащий 2 мМ CaCl<sub>2</sub> и 10 мМ HEPES с рН 7,4) температурой 37°C в количестве 50 мкл/луночка. Колебания исследовали как в при-



лина) лизаты разводили (или не разводили) в смеси для лизиса. Затем лизаты добавляли в планшеты для захвата (96-луночные полистирольные планшеты, покрытые зондами для захвата) в общем объеме 80 мкл/лунка. Реактивы с рабочими зондами в наборах получали посредством объединения не содержащей нуклеаз воды (12,1 мкл), смеси для лизиса (6,6 мкл), блокирующего реактива (1 мкл) и конкретного набора зондов 2.0 (0,3 мкл) (человеческий SNCA с номером в каталоге SA-50528, человеческий PROS1 с номером в каталоге SA-10542 или человеческий бета-3-тубулин с номером в каталоге SA-15628) в соответствии с инструкциями производителя (QUANTIGENE® 2.0 AFFYMETRIX®). Затем 20 мкл реактивы с рабочими зондами в наборе добавляли к 80 мкл разведенного лизата (или 80 мкл смеси для лизиса в случае фоновых образцов) на планшете для захвата. Планшеты центрифугировали при 240g в течение 20 с, а затем инкубировали в течение 16-20 ч при 55°C для гибридизации (захвата целевой РНК).

Аmplификацию сигнала и выявление целевой РНК начинали посредством промывания планшетов буфером 3 раза (300 мкл/лунка) для удаления любого несвязанного материала. Далее добавляли реактив для гибридизации 2.0 Pre-Amplifier hybridization reagent (100 мкл/лунка), инкубировали при 55°C в течение 1 ч, затем его отсасывали и добавляли промывочный буфер и отсасывали его 3 раза. Затем добавляли реактив для гибридизации 2.0 Amplifier hybridization reagent, как описано (100 мкл/лунка), инкубировали в течение 1 ч при 55°C и стадию промывания повторяли, как описано выше. Далее добавляли реактив для гибридизации 2.0 Label Probe hybridization reagent (100 мкл/лунка), инкубировали в течение 1 ч при 50°C и стадию промывания повторяли, как описано выше. Планшеты опять центрифугировали при 240g в течение 20 с для удаления любого избытка промывочного буфера, а затем добавляли субстрат 2.0 Substrate (100 мкл/лунка) в планшеты. Планшеты инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, а затем планшеты визуализировали на работающем с несколькими метками ридере PerkinElmer Envision в режиме люминометра в течение 15 мин.

Определение данных: Для гена, представляющего интерес, средний фоновый сигнал в анализе вычитали из среднего сигнала для каждой технической повторности. Средние сигналы для гена, представляющего интерес, за вычетом фонового сигнала затем нормализовали к среднему сигналу для конститутивной РНК тубулина за вычетом фонового сигнала. Выраженное в процентах ингибирование для обработанного образца рассчитывали относительно лизата образца, обработанного контролем. Результаты анализов QUANTIGENE® для клеток, обработанных ASO, представлены, например, на фиг. 8.

Пример 2D. Анализ QUANTIGENE® (анализ в 96-луночном планшете) для измерения снижения уровней мРНК в клетках Ramos.

Для измерения возможного снижения уровней нецелевой мРНК человеческого IKZF3 (белок 3 семейства IKAROS с доменом "цинковые пальцы") применяли клетки Ramos (клеточную линию лимфоцитов человека). Поскольку клетки Ramos не экспрессируют SNCA, RB1 (RB транскрипционный корепрессор 1), который экспрессируется в клетках Ramos, использовали в качестве положительного контроля для оценки опосредованного ASO нокдаун экспрессии мРНК IKZF3. Синтезировали два ASO, которые связываются с мРНК человеческого RB1 и обеспечивают нокдаун экспрессии мРНК человеческого RB1. Бета-2-микроглобулин (P2M) использовали в качестве контрольного конститутивного гена. Клетки Ramos выращивали в суспензии в среде RPMI, дополненной FBS, глутамином и пенициллином/стрептомицином.

Лизис: Клетки высевали на покрытые поли-L-орнитином/ламинином 96-луночные планшеты в количестве 20000 клеток на лунку и поддерживали в нейробазальной среде, содержащей B27, glutamax и пенициллин-стрептомицин. ASO разводили в воде и добавляли к клеткам через 1 сутки после посева (DIV01) до конечной концентрации, составляющей 1 мкМ. После обработки ASO клетки инкубировали при 37°C в течение 4 суток для достижения установившегося снижения уровня мРНК. После инкубирования среду удаляли и клетки подвергали последующему лизису. Измерение матричной РНК осуществляли с применением системы реактивов QUANTIGENE® 2.0 Reagent System (AFFYMETRIX®), которая количественно анализировала РНК с применением способа усиления сигнала с использованием разветвленной ДНК, зависящего от специально сконструированного набора зондов для захвата РНК. Смесь для лизиса (QUANTIGENE® 2.0 AFFYMETRIX®) предварительно подогревали в инкубаторе при 37°C в течение 30 мин. Для лизиса клеток в суспензии 100 мкл 3×буфера для лизиса (с 10 мкл/мл протеиназы К) добавляли к 200 мкл клеток в суспензии. Клетки затем гомогенизировали 10 раз для лизиса и планшет запечатывали и инкубировали в течение 30 мин при 55°C. После этого, лизаты хранили при -80°C или сразу подвергали анализу.

Анализ: В зависимости от конкретного применяемого зонда для захвата (т.е. IKZF3, RB1 и P2M) лизаты разводили (или не разводили) в смеси для лизиса. Затем лизаты добавляли в планшет для захвата (96-луночный полистирольный планшет, покрытый зондами для захвата) в общем объеме 80 мкл/лунка. Реактивы с рабочими зондами в наборах получали посредством объединения 12,1 мкл не содержащей нуклеаз воды, 6,6 мкл смеси для лизиса, 1 мкл блокирующего реактива, 0,3 мкл конкретного набора зондов 2.0 (человеческий IKZF3 с номером в каталоге SA-17027, человеческий RB1 с номером в каталоге SA-10550 или человеческий бета-2-микроглобулин с номером в каталоге SA-10012) в соответствии с инструкциями производителя (QUANTIGENE® 2.0 AFFYMETRTX®). Затем 20 мкл реактивы с рабочими

зондами в наборе добавляли к 80 мкл разведенного лизата (или 80 мкл смеси для лизиса в случае фоновых образцов) на планшете для захвата. Планшеты затем инкубировали в течение 16-20 ч при 55°C для гибридизации (захвата целевой РНК). Усиление сигнала и выявление целевой РНК начинали посредством промывания планшетов буфером 3 раза (300 мкл/лунка) для удаления любого несвязанного материала. Далее добавляли реактив для гибридизации 2.0 Pre-Amplifier hybridization reagent (100 мкл/лунка), инкубировали при 55°C в течение 1 ч, затем его отсасывали и добавляли промывочный буфер и отсасывали его 3 раза. Затем добавляли реактив для гибридизации 2.0 Amplifier hybridization reagent, как описано (100 мкл/лунка), инкубировали в течение 1 ч при 55°C и стадию промывания повторяли, как описано выше. Далее добавляли реактив для гибридизации 2.0 Label Probe hybridization reagent (100 мкл/лунка), инкубировали в течение 1 ч при 50°C и стадию промывания повторяли опять, как описано выше. Планшеты опять центрифугировали при 240g в течение 20 с для удаления любого избытка промывочного буфера, а затем добавляли субстрат 2.0 Substrate (100 мкл/лунка) в планшеты. Планшеты инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, а затем планшеты визуализировали на работающем с несколькими метками ридере PerkinElmer Envision в режиме люминометра в течение 15 мин.

Определение данных: Для гена, представляющего интерес, средний фоновый сигнал (т.е. без лизата, только 1× буфер для лизиса) вычитали из среднего сигнала для каждой технической повторности. Средние сигналы для гена, представляющего интерес, за вычетом фонового сигнала затем нормализовали к среднему сигналу для конститутивной мРНК за вычетом фонового сигнала (в случае клеток Ramos она представляла собой мРНК бета-2-микроглобулина). Выраженное в процентах ингибирование для обработанного образца рассчитывали относительно среднего значения для лизата необработанного образца. Результаты анализов QUANTIGENE® для клеток, обработанных ASO, представлены в табл. 4.

Пример 2Е. qPCR анализ для измерения снижения мРНК SNCA в клетках SK-N-BE(2).

ASO SAN-005459, целенаправленно воздействующим на SNCA, исследовали в отношении его способности у снижению экспрессии мРНК SNCA в клетках нейроblastомы человека SK-N-BE(2), полученной из ATCC (CRL-2271).

Клетки SK-N-BE(2) выращивали в среде культивирования клеток (MEM [Sigma, номер в каталоге M2279], дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки [Sigma, номер в каталоге F7524], 1× GLUTAMAX™ [Sigma, номер в каталоге 3050-038], 1× раствором заменимых аминокислот MEM [Sigma, номер в каталоге M7145] и 0,025 мг/мл гентамицина [Sigma, номер в каталоге G1397]). Клетки трипсинизировали каждые 5 суток посредством промывания фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) [Sigma, номер в каталоге 14190-094] с последующим добавлением 0,25% раствора трипсина-EDTA (Sigma, T3924), 2-3 минутами инкубирования при 37°C и гомогенизацией перед посевом клеток. Клетки поддерживали в культуре в течение периода до 15 пассажей.

Для применения в эксперименте 12500 клеток на лунку высевали в 96-луночные планшеты (Nunc, номер в каталоге 167008) в 100 мкл ростовой среды. Олигонуклеотиды получали из 750 мкМ маточного раствора. ASO, растворенный в PBS, добавляли примерно через 24 ч после посева клеток до конечной концентрации, составляющей 25 мкМ в случае исследований с одной концентрацией. Клетки инкубировали в течение 4 суток без какой-либо замены среды. Для измерения активности готовили 8 концентраций ASO для диапазона значений конечной концентрации 16-50000 нМ. ASO-004316 (CcAAAtcttaataACtAC, SEQ ID NO: 25) и ASO-002816 (TTCctttacaccACAC, SEQ ID NO: 12) включали в качестве контролей. После инкубирования клетки собирали посредством удаления среды с последующим добавлением 125 мкл буфера для лизиса PURELINK® Pro 96 (Invitrogen 12173.001 A) и 125 мкл 70% этанола. РНК очищали в соответствии с инструкцией производителя и элюировали в конечном объеме 50 мкл воды, с получением в результате концентрации РНК, составляющей 10-20 нг/мкл. РНК разводили 10-кратно в воде перед одностадийной реакцией qPCR. Для одностадийной реакции qPCR qPCR-микс (qScript TMXLE 1-step RT-qPCR TOUGHMIX® Low ROX от QauntaBio, номер в каталоге 95134-500) смешивали с двумя зондами Taqman в соотношении 10:1:1 (qPCR-микс:зонд 1:зонд 2) с образованием мастер-микса. Зонды Taqman получали OLifeTechnologies: SNCA: Hs01103383\_ml; PROS1: Hs00165590\_ml; TBP: 4325803; GAPDH 4325792. Мастер-микс (6 мкл) и РНК (4 мкл, 1-2 нг/мкл) затем смешивали в планшете для qPCR (384-луночные планшеты MICROAMP® с оптически прозрачным дном, 4309849).

После запечатывания планшет подвергали быстрому центрифугированию при 1000g в течение 1 мин при RT (комнатная температура) и переносили в систему ViiATM 7 (Applied Biosystems, Thermo), и использовали следующие условия ПЦР: 50°C в течение 15 мин; 95°C в течение 3 мин; 40 циклов: 95°C в течение 5 с с последующим снижением температуры на 1,6°C/с с последующим поддержанием при 60°C в течение 45 с. Данные анализировали с применением программного обеспечения для ПЦР в реальном времени QUANTSTUDIO™.

Пример 3. In vitro анализ ASO-005459 в отношении снижения уровней мРНК человеческого SNCA.

ASO-005459 представляет собой ASO из 17 оснований, модифицированный LNA, который целенаправленно действует на границу интрона 1/экзона 2 в пре-мРНК человеческого SNCA (см. фиг. 2, SEQ ID NO: 15).

Активность ASO-005459 в мышинных нейронах.

При использовании способов, описанных выше в примере 2А, ASO-005459 исследовали в отношении его способности к снижению экспрессии белка SNCA как дальнейший результат снижения уровня мРНК SNCA. Вкратце, первичные нейроны, полученные от PAC-A53T мышей, обрабатывали ASO-005459 или контрольными ASO в течение 14 суток. Клетки затем фиксировали и уровни белка SNCA и белка тубулина измеряли с помощью визуализации высокого содержания. Уровни тубулина измеряли для мониторинга токсичности и для нормализации снижения уровня белка SNCA.

Как показано в табл. 1 ниже, инкубирование клеток с 4 нМ ASO-005459 приводило в результате к снижению экспрессии белка SNCA на 21%. При использовании 40 нМ и 5 мкМ ASO-005459 экспрессия белка SNCA снижалась на 84% и 86%, соответственно. В отличие от этого, ASO-005459 оказывал минимальное воздействие или не оказывал воздействия на уровень экспрессии белка тубулина.

Таблица 1  
Активность ASO-005459 в нейронах A53T-PAC

Концентрация ASO-005459	Ингибирование $\alpha$ -синуклеина/тубулина, %	SD	N	Ингибирование тубулина, %	SD	N
4 нМ	21,11	33,71	3	-8,60	12,07	4
40 нМ	84,28	13,21	8	4,32	28,65	7
5 мкМ	86,45	7,91	2	29,01	18,06	2

SD = стандартное отклонение

N = число тестов

Для дальнейшей оценки активности нейроны A53T-PAC обрабатывали 10 последовательно снижающимися концентрациями ASO-005459, как описано выше в примере 2А, и определяли значения IC<sub>50</sub> для воздействия на белки SNCA и тубулина. Как показано на фиг. 7А и 7В и в табл. 2 (ниже), наблюдали зависимое от концентрации снижение соотношения  $\alpha$ -синуклеин/тубулин, причем средняя IC<sub>50</sub> составляет 7,4 нМ. Это наблюдение согласовалось с данными активности для одной концентрации, представленными в табл. 1 (выше). Более того, ASO-005459 оказывал пренебрежимо малое воздействие на уровни тубулина. В совокупности эти результаты указывают на то, что ASO-005459 активно снижает уровни белка SNCA с минимальным воздействием на общую жизнеспособность клетки.

Таблица 2  
Оценки активности и селективности ASO-005459 в отношении SNCA и белка тубулина в нейронах A53T-PAC

IC <sub>50</sub> для $\alpha$ -синуклеина/тубулина (нМ)	SD	N	IC <sub>50</sub> для тубулина (нМ)	SD	N
7,42	2,73	6	>4000	NA	5

SD = стандартное отклонение

N = число тестов

Эффективность ASO-005459 в клетках SK-N-BE(2).

При использовании способа, описанного в примере 2Е, ASO-005459 исследовали в отношении его способности к снижению уровня мРНК SNCA в SK-N-BE(2) после 4 суток обработки.

Инкубирование клеток с 25 мкМ ASO-005459 приводило в результате к снижению уровня мРНК SNCA в SK-N-BE(2) клетках на 92%.

Активность ASO-005459 в человеческих нейронах.

Активность ASO-005459 в отношении SNCA подтверждали с использованием первичных нейронов человека, как описано выше в примере 2С. Вкратце, человеческие нейроны получали из индуцированных плюрипотентных стволовых (iPS) клеток. Клетки обрабатывали ASO-005459 или контрольными ASO в течение 6 суток, а затем уровни мРНК измеряли с помощью анализа QUANTIGENE®. Поскольку человеческие нейроны также экспрессируют PROS1, потенциальную нецелевую мишень для ASO-005459, уровень мРНК PROS1 также измеряли для оценки воздействия ASO-005459 на нецелевые гены. Кроме того, мРНК тубулина (TUBB) измеряли для мониторинга токсичности.

Как показано на фиг. 8 и в табл. 3 (ниже), ASO-005459 индуцировал зависимое от концентрации снижение уровня SNCA, экспрессирующегося в человеческих нейронах, причем средняя IC<sub>50</sub> составляет 100 нМ. Эта IC<sub>50</sub> в -13 раз слабее, чем IC<sub>50</sub> для снижения уровня белка SNCA в нейронах PAC-A53T (табл. 2, выше). Причиной этого сдвига активности не ясна, но может быть обусловлена различиями в поглощении, метаболизме ASO или кинетическими характеристиками нокдауна SNCA. Несмотря на то что ASO-005459 также проявлял зависимые от концентрации снижения уровней мРНК PROS1 в человеческих нейронах; IC<sub>50</sub> была в 30-50 раз слабее, чем IC<sub>50</sub> для SNCA. Эти результаты подтверждают активность ASO-005459 в отношении SNCA в человеческих нейронах и указывают на то, что ASO-005459 яв-

ляется в 30-50 раз более селективным в отношении SNCA по сравнению с PROS1.

Таблица 3  
Активность и селективность ASO-005459 в отношении мРНК SNCA и PROS1 в человеческих нейронах

Дата анализа	Партия	SNCA IC <sub>50</sub> (нМ)	PROS1 IC <sub>50</sub> (нМ)	TUBB3 IC <sub>50</sub> (нМ)	Соотношение IC <sub>50</sub> для PROS1/SNCA
8.26.2016	01-001	42	2127	>5000	51
12.8.2016	01-004	157	>5000	>5000	>32

Партия=конкретный номер партии применяемого ASO-005459

Активность ASO-005459 в клетках Ramos.

IKZF3 является еще одной потенциальной нецелевой мишенью для ASO-005459, но, в отличие от PROS1, он не экспрессируется в человеческих нейронах. Вместе с тем, IKZF3 сильно экспрессируется в клетках Ramos, клеточной линии лимфоцитов человека. Клетки Ramos обрабатывали 1 мкМ ASO-005459 и измеряли воздействие на экспрессию мРНК IKZF3.

Для мониторинга токсичности также измеряли уровень мРНК бета-2-микроглобулина. Поскольку клетки Ramos не экспрессируют SNCA, другой ген, RB1 (RB транскрипционный корепрессор 1), использовали в качестве положительного контроля для опосредованного ASO нокдауна. ASO-006754 (GGTgaggttggaGA, SEQ ID NO: 26) и ASO-006755 (GGTgaggttggtagaAG, SEQ ID NO: 27) оказывают целенаправленное воздействие на RB1, и их включили в исследование. Как показано в табл. 4 (ниже), в концентрации 1 мкМ ASO-005459 не оказывал воздействия на экспрессию мРНК IKZF3, демонстрируя специфичность ASO-005459 в отношении SNCA. ASO-005459 также не оказывали воздействия на экспрессию мРНК RB1 и P2M, что указывает на то, что ASO-005459 не является токсичным для клеток Ramos. В отличие от этого, ASO-006754 и ASO-006755 (контрольные ASO) снижали уровни RB1 на 87% и 83%, соответственно, подтверждая активность ASO в клетках Ramos.

Таблица 4  
Воздействие 1 мкМ ASO-005459 на IKZF3 в клетках Ramos

ASO	Мишень	Партия	IKZF3 (% конц.)	RB1 (% конц.)	$\beta$ 2M (% конц.)
ASO-005459	SNCA	01-004	102	99	94
ASO-006754	RB1	01-001	104	13	87
ASO-006755	RB1	01-001	116	17	83

Партия=конкретный номер партии применяемого ASO

В совокупности результаты, представленные в данной таблице, демонстрируют, что ASO-005459 является активным и высокоселективным в отношении снижения уровня мРНК SNCA, что, в свою очередь, опосредует снижение уровней белка SNCA. Результаты также демонстрируют, что ASO-005459 имеет хорошую переносимость как в мышинных, так и в человеческих нейронах. Эти данные обосновывают продолжающуюся разработку ASO-005459 в качестве модифицирующего заболевание терапевтического средства для лечения синуклеопатий.

Пример 4. Переносимость *in vivo* и снижение уровня мРНК SNCA *in vivo*.

Переносимость *in vivo* выбранных ASO исследовали для того, чтобы увидеть, как ASO переносятся при инъекционном введении различным модельным животным (т.е. мышам и яванским макакам).

Мыши.

Субъекты: Самцов и самок PAC-Tg(SNCA<sup>A53T</sup>)<sup>+/+</sup>; SNCA<sup>-/-</sup> ("PAC-A53T") мышей (возрастом 2-3 месяца), несущих полный ген человеческого SNCA с мутацией A53T на фоне нокаутного мышинного SNCA, использовали для кратковременных, долговременных исследований эффективности и исследований РК/PD *in vivo*. В некоторых случаях (WT) C57B/6 мышей дикого типа использовали для долговременной (т.е. 4 недели) оценки состояния здоровья. Мышей содержали группами по 4 или 5 в виварии с контролируемой температурой с доступом к корму и воде *ad libitum*. Все процедуры, в которых были задействованы мыши, проводили в соответствии с методами испытаний на животных (Animal Test Methods) (ATM), одобренными Комитетом по уходу и использованию животных компании "Бристоль-Майерс Сквибб" (Bristol-Myers Squibb Animal Care and Use Committee) (ACUC).

Приготовление дозируемого раствора ASO: Шприцы со стерильным солевым раствором (1 мл) шприцы, оснащенные фильтрами Whatman с размером ячеек 0,2 мкм, и не содержащие нуклеаз центрифужные пробирки использовали для приготовления дозируемых растворов. Указанный объем воды или солевого раствора добавляли к порошку ASO и перемешивали на вихревой мешалке (~1 мин) для растворения порошка ASO. Раствору затем позволяли осесть в течение 10 мин и опять перемешивали на вихревой мешалке в течение ~1 мин. Пробирки недолго центрифугировали, чтобы вернуть всю жидкость на дно пробирки, а затем раствор фильтровали через стерильный фильтр с размером ячеек 0,2 мкм во 2-ю не содержащую РНКаз пробирку. Небольшую аликвоту первичного маточного раствора разводили до 1

мг/мл для анализа концентрации с использованием Nanodrop. Аналитический образец перемешивали на вихревой мешалке три раза с переворачиванием вручную для тщательного смешивания. Затем спектральную поглотительную способность образца в УФ измеряли дважды при длине волны 260 нм с использованием Nanodrop (пьедестал промывали и вытирали три раза перед нанесением образца). Исследуемый образец сливали после того, как анализ завершали. Образец считали готовым для дозирования, если его спектральная поглотительная способность в УФ составляла от 90 до 110% образца. Если спектральная поглотительная способность в УФ превышала 110% образца, готовили вторичное разведение; если спектральная поглотительная способность составляла <90%, образец готовили в более высокой исходной концентрации, и за этим следовали подобные стадии, как описано выше. Образцы хранили при 4°C до применения.

Ручная интрацеребровентрикулярная инъекция (ICV): ICV инъекции осуществляли с использованием микрошприца Hamilton, оснащенного иглой 27 или 30 калибра, в соответствии со способом Haley и McCormick. Иглу оснащали полиэтиленовым ограничителем в 2,5-3 мм от кончика для того, чтобы ограничить ее проникновение в головной мозг. Мыши получали анестезию с использованием изофлуранового анестезирующего средства (1-4%). После обеспечения достаточной анестезии мышью удерживали за складку кожи позади шеи большим и указательным пальцами одной руки. Прикладывая аккуратное, но сильное давление, голову животного затем обездвиживали посредством прижатия к твердой плоской поверхности. Введение доз осуществляли с использованием шприцов Hamilton объемом 10 мкл, оснащенных иглой калибра 27<sup>1/2</sup> g. Кончик иглы затем вводили через кожу черепа и череп, приблизительно в 1 мм сбоку и в 1 мм сзади относительно брегмы (т.е. справа от срединной линии, приблизительно в 3 мм сзади при измерении от линии глаз). После того как иглу устанавливали, ASO давали в объеме 5 мкл в среде солевого раствора и вводили инъекцией за ~30 с. Иглу оставляли на месте на 5-10 с до удаления. Мышей возвращали в клетки, где их содержали, и им позволяли восстановиться в течение ~2-4 мин. За мышами непрерывно осуществляли наблюдение в течение 30 мин непосредственно после введения дозы для оценки неблагоприятных эффектов лекарственного средства и/или введения дозы в отношении поведения. В течение этого периода времени любую мышь, у которой возникали конвульсии более чем в 3 отдельных момента, немедленно умерщвляли и автоматически давали оценку 20. Переносимость лекарственного средства оценивали через 1 ч ± 15 мин после введения дозы. Животных, получавших дозы непереносимых соединений (оценка переносимости >4), умерщвляли сразу после оценки в течение 1 ч.

Оценка переносимости ASO: Животных, получавших дозы ASO, оценивали сразу после введения дозы и подвергали мониторингу любых неблагоприятных эффектов в течение 2 ч. В случае исследований острой переносимости (AT) мышью оценивали в момент введения доз и опять в момент выхода из исследования, т.е. через 3 суток после инъекции ASO. В случае долговременной оценки состояния здоровья мышью взвешивали еженедельно и подвергали мониторингу в отношении любых проблем со здоровьем и поведением до завершения эксперимента. Мышей, которые имели потери массы, составляющие более 15% от их исходной массы тела, или демонстрировали проблемы с переносимостью, исключали из исследований и умерщвляли. Оценки состояния здоровья и переносимости осуществляли согласно следующей схеме.

Таблица 5  
Система оценки переносимости<sup>a</sup>

Категория	Оценка 1	Оценка 2	Оценка 3	Оценка 4
<b>Гиперактивность, стереотипии, поведение в клетке постоянного содержания</b>	•Очень незначительно повышенное исследование или подъем на задние лапы по сравнению с контролями	•Повышенное исследование клетки постоянного проживания (например, выкапывание, закапывание и т.д.) •Повышенный уход за поверхностью тела	•Умеренно повышенная активность в клетке постоянного содержания •Выявляемые стереотипии (например, движение по кругу, патологически циклические действия и т.д.)	•Выраженная гиперактивность •Выраженные стереотипии
<b>Пониженная настороженность, исследовательское поведение и реактивность</b>	•Некоторое снижение исследовательской активности •Нормально отвечает на стимуляцию	•Сонливость •Незначительно сниженная реактивность на прикосновение или манипуляцию	•Оцепенение (пониженная реактивность, пониженный роговичный рефлекс)	•Коматозное состояние (не отвечает на стимуляцию, например, нет роговичного рефлекса)
<b>Координация движений и сила</b>	•Легкое изменение походки или силы хвата (падает за 5-10 секунд) •Без падений, нормальная реакция в виде восстановления положения тела	•Пониженная сила хвата (падает менее чем за 5 секунд) •Легкая атаксия (например, замедленная реакция в виде восстановления положения тела, качание)	•Сильно пониженная сила хвата (падает менее чем за 2 секунды) •Атаксия (например, шатание, нарушенная ходьба падением)	•Тяжелая атаксия (например, ползание, неспособность захватить планку) •Невозможно восстановление положения тела
<b>Поза, внешний вид, дыхание</b>	•Очень незначительно выраженная ненормальная поза (едва различимая)	•Незначительно выраженная ненормальная поза (например, сгорбленность, вытянутая, низкая поза, положение хвоста, Штрауб-хвост) •Пилоэрекция или опущение верхнего века •Растрепанная шерсть	•Умеренно выраженная ненормальная поза (например, положение лежа на животе) •Поверхностное дыхание	•Заметно выраженная ненормальная поза (например, положение лежа на боку) •Паралич лицевого нерва (например, слюнотечение, высунутый язык) •Затрудненное дыхание
<b>Тремор, гиперактивность, конвульсии</b>	•Выявляемый тремор	•Чрезмерная реакция на стимулы (например, шум) •Заметный тремор	•Малое количество судорог или частичные судороги, подъем на задние лапы и падение в ходе конвульсий	•Повторяющиеся или непрерывные судороги (бег, подергивание, клонические и/или тонические судороги)

<sup>a</sup> Нормальное состояние соответствует оценке "0"

Животных оценивают на индивидуальной основе в последовательные моменты времени после введения дозы. Наблюдения планируют через 1 ч±15 мин, затем 24 ч±2 ч, затем через 7 суток (при необходимости). Конвульсии подсчитывают в течение периода составляющего 1 ч, даже если они имели место до периода наблюдения. Общую оценку переносимости рассчитывают, исходя из суммы оценок в отдельных категориях, причем максимальная возможная оценка составляет 20.

Сбор ткани: После окончательных оценок поведения и состояния здоровья мышей декапитировали

на гильотине и головные мозги быстро удаляли. Каждый головной мозг разделяли на два полушария и а) гиппокамп вырезали для измерений уровней мРНК в 3-суточном исследовании острой переносимости; б) гиппокамп, ствол головного мозга и полосатое тело из одного полушария вырезали для измерений мРНК, в то время как такие же области вырезали из второго полушария для измерений уровней белка/ПК-характеристик в динамических ПК/PD исследованиях зависимости "доза-эффект".

В некоторых из исследований кровь и спинномозговую жидкость (CSF) также собирали для измерений ПК-характеристик (кровь) и ПК/белка (CSF). Для сбора крови и CSF мышей подвергали глубокой анестезии с использованием изофлурана (4%). Кровь собирали посредством прокола сердца с использованием иглы 23G. После удаления кровь переносили в 2 мл пробирки BD Microtainer (K2EDTA BD #365974) и помещали на лед до обработки. Для обработки крови пробирки центрифугировали при 4500×g в течение 10 мин при 4°C. Затем плазму удаляли и помещали в 0,5 мл пробирки Eppendorf и хранили при -80°C до применения. Для сбора CSF полость грудной клетки открывали, обнажая сердце, и максимальное количество крови дренировали во избежание контаминации CSF. Образцы CSF собирали через мозжечково-мозговую цистерну с использованием микропипеток и помещали в пробирки lo-bind protein Eppendorf. Затем пробирки центрифугировали при 4500×g в течение 15 мин при 4°C. CSF аккуратно переносили в чистые пробирки lo-bind Eppendorf объемом 0,5 мл и хранили при -80°C до дальнейшего применения.

Данные от яванских макаков.

Субъект: Использовали самцов яванских макаков массой 3,5-10,0 кг в начале исследования. Каждому имплантировали интратекальный катетер для спинномозговой жидкости (CSF), входящий в позвонки L3 или L4. Дистальный конец полиуретанового катетера проходил в пределах интратекального пространства примерно до позвонка L1. Проксимальный конец был соединен с подкожным выходным портом, расположенным на пояснице животного. Обеспечивали возможность заживления ран у животных в течение по меньшей мере двух недель до начала исследования. Уход за лабораторными животными осуществляли в соответствии с Политикой государственной службы здравоохранения по уходу за пациентами и применению лабораторных животных и Руководством по уходу и использованию лабораторных животных (Public Health Service Policy on the Humane Care and Use of Laboratory Animals and the Guide for the Care and use of Laboratory Animals NRC (2011) (National Research Council: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health). National Academies Press (US), Washington (DC)). Протокол был одобрен Уоллингфордским комитетом по уходу и использованию животных в компании "Бристоль-Майерс Сквибб" (Wallingford Animal Care and Use Committee of the Bristol-Myers Squibb Company).

Получение образцов CSF и крови: К порту для сбора CSF получали доступ подкожно с использованием аспиктических методик и образцы CSF забирали у бодрствующих животных, сидящих вертикально в фиксирующем кресле для приматов. Примерно 0,1 мл CSF сливали вначале сбора для прочистки застойного пространства в катетере и порте. CSF собирали с помощью самотечного течения до объема максимум 0,5 мл CSF на образец. CSF центрифугировали при 2000 g при 4°C в течение 10 мин. Супернатант замораживали на сухом льду или в жидком азоте и хранили при -90°C до анализа.

Образцы крови забирали из доступной вены, как правило, из подкожной вены. Образцы крови готовили с помощью ряда процедур в зависимости от конкретного обсуждаемого измерения. Для получения плазмы кровь собирали в обработанные EDTA пробирки. Для получения сыворотки кровь собирали в пробирки для отделения сыворотки и позволяли свертывание в течение по меньшей мере 30 мин перед центрифугированием. Для измерений свертывания и факторов свертывания кровь собирали в содержащие цитрат пробирки, а для анализа РНК кровь собирали в пробирки, содержащие реактив RNA later. После обработки образцы замораживали на сухом льду или в жидком азоте и хранили замороженным до анализа.

Интратекальное введение доз: Животных тренировали тренировал получать дозу в состоянии бодрствования и при использовании модифицированных коммерчески доступных фиксирующих кресел, животных поддерживали в лежачем положении. Целенаправленно воздействующие на SNCA антисмысловые олигонуклеотиды (ASO) растворяли в солевом растворе, стерилизовали посредством фильтрации и вводили со скоростью 0,33 мл/мин, в объеме 1,0 мл с последующим промыванием 0,5 мл стерильной воды. Общее время инфузии составляло 4,5 мин. Животных оставляли в лежачем положении на 30 мин после инфузии.

Вскрытие: Яванским макакам вводили соответствующий объем коммерчески доступного раствора для эвтаназии при анестезии с использованием кетамин и/или изофлурана. Ткани получали сразу после вскрытия и головной мозг переносили на лед для препарирования. Представляющие интерес области препарировали с получением 4-6 мм срезов с использованием матрицы ASI Cyno Brain Matrix, а также ручных методик. Образцы помещали свежими в реактив RNAlater или замораживали на льду для последующего анализа. Ткань ЦНС быстро вырезали у яванских макаков и кусочки длиной не более чем 4 мм по любой оси собирали и помещали в 5 мл реактива RNA later. Образцы хранили при 4°C в течение ночи, затем переносили в условия с температурой -20°C для хранения до анализа. Анализируемые области го-

лового мозга включали в себя продолговатый мозг, варолиев мост, средний мозг, мозжечок, дорсальный отдел полосатого тела (левый и правый), гиппокамп (левый и правый), лобную долю коры головного мозга (левую и правую), височную долю коры головного мозга (левую и правую), теменную долю коры головного мозга (левую и правую), затылочную долю коры головного мозга (левую и правую) и белое вещество коры головного мозга. Кроме того, собирали образцы спинного мозга в шейном, грудном и поясничном отделах. Также собирали образцы из печени, почки и сердца. В некоторых случаях собирали образцы ядер тройничного нерва, большеберцового нерва и аорты для оценки нецелевых фармакологических свойств в этих областях.

Количественное определение концентрации ASO методом ELISA в тканях, плазме крови и CSF мыши или обезьяны.

Ткань гомогенизировали с плазмой крови и водой в соотношении 1:1. Калибровочную кривую строили на основании 2-кратного серийного разведения от 5000 до 4,9 нМ в плазме крови (для плазмы крови и CSF) и в смеси плазма:вода (для образцов тканей), а затем дополнительно разводили до суммарного 5000-кратного разведения только 5×SSCT (750 мМ NaCl и 75 мМ цитрат натрия, pH 7,0, содержащий 0,05% (об./об.) Tween-20) и в 5×SSCT, содержащем 35 нМ реактива для захвата и 35 нМ реактива для выявления, с получением стандартного диапазона 1-1000 пМ. Используемый коэффициент разбавления варьировал в зависимости от ожидаемого диапазона концентрации образца. Зонд для захвата представлял собой AAAGGAA с 3'-биотином (Exiqon), и зонд для выявления представлял собой 5' DigN-изопропил-18 линкер-GTGTGGT (Exiqon).

Экспериментальные образцы и стандарты добавляли в буфер для лизиса Clarity (Phenomenex, номер в каталоге AL0-8579) в соотношении 1:1 перед разведением буфером для захвата и буфером для выявления и перед переносом в планшет для ELISA. Образцы CSF разводили плазмой крови (2-кратно) перед добавлением буфера для лизиса. Покрытый стрептавидином планшет (Thermo 15119) промывали 3 раза 5×SSCT буфером. Образцы объемом 100 мкл добавляли и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Зонд для выявления - 100 мкл AP-Fab-фрагмента против Dig, разведенного в соотношении 1:4000 в PBS, содержащем 0,05% Tween-20 (Roche Applied Science, номер в каталоге 11 093 274 910), добавляли и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. После промывания планшета 2×SSCT буфером 100 мкл субстрата Tropix CDP-star Sapphire II (Applied Biosystems) добавляли в течение 30 мин при комнатной температуре. Концентрации антисмыслового олигонуклеотида измеряли с помощью люминесценции (Enspire-PerkinElmer).

Измерения белка альфа-синуклеина.

Образцы тканей головного мозга гомогенизировали в объеме 10 мл/г ткани в RIPA буфере (50 мМ Tris HCl, 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% додецилсульфат натрия) с использованием шарикового гомогенизатора Qiagen Tissuelyser II при 25 циклов/секунду с 5 мм стальными шариками в течение в общей сложности 2 минут. Гомогенизированные образцы инкубировали 30 мин на льду. Аликвоту каждого образца объемом 50 мкл сохраняли для анализа РК-характеристик. Остальные образцы центрифугировали при 20800g в течение 60 мин при 4°C. Супернатант сохраняли и использовали для анализа. Общий белок измеряли с использованием набора для анализа белка Pierce BCA protein assay kit (23227).

Экстракты тканей головного мозга: Белок SNCA измеряли с использованием ELISA MJFR1+4B12. Кратко, планшеты для ELISA (Costar) покрывали 100 мкл антитела MJFR1 к SNCA (Abcam) в концентрации, составляющей 0,1 мкг/мл, разведенным ВирН карбонат-бикарбонатным буфером, pH 9,4 (Thermo Scientific), в течение ночи (O/N) при 4°C. На следующие сутки планшеты промывали 4 раза PBS со средой Дульбекко (Life Technologies) и блокировали 3% BSA (бычий сывороточный альбумин, не содержащий протеаз, фракция V, Roche Diagnostic) в PBS в течение 2-3 ч при комнатной температуре (RT) или в течение ночи при 4°C. Как стандарты, так и образцы головного мозга разводили 1% BSA/0,05% Tween/PBS, содержащим ингибитор протеазы Roche (Roche 11836145001, 1 гранула/25 мл) и ингибитор фосфатаз 2 и 3 (Sigma, 1:100). В качестве стандарта использовали SNCA дикого типа (rPeptide). Образцы загружали в двух параллелях (50 мкл/лунка) и инкубировали в течение O/N при 4°C. После того как планшеты уравнивали до RT, 50 мкл антитела 4B12 для выявления (Biolegend) (разведенного в соотношении 1:4000 в 1% BSA/0,1% Tween/DPBS) добавляли в каждую лунку и инкубировали совместно с образцами при RT в течение ~2 ч. Антитело для выявления предварительно конъюгировали с щелочной (набор AP от Novus Biologicals). Планшеты затем промывали 4 раза 0,05% Tween/PBS и проявляли с использованием 100 мкл субстрата щелочной фосфатазы (Tropix CDP Star Ready-to-Use with Sapphire II, T-2214, Life Technologies) в течение 30 мин. Количество импульсов счета люминесценции измеряли с использованием Perkin Elmer EnVision (2102 Multilabel Reader). Планшеты поддерживали при постоянном встряхивании (шейкер для трировальных планшетов, 3 скорость) во время анализа. Данные анализировали с применением программного обеспечения GraphPad Prism. Общий белок в ткани головного мозга измеряли с применением набора для анализа белка Micro protein assay kit (ThermoFisher #23235) в соответствии с инструкциями производителя.

Спинальная жидкость (CSF): Уровни белка SNCA измеряли с применением набора U-PLEX

Human SNCA Kit: (номер в каталоге K151WKK-2, Meso Scale Discovery) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы CSF разводили 10-кратно. Уровни гемоглобина измеряли в образцах CSF с использованием набора для ELISA Abcam mouse Hemoglobin ELISA kit (ab157715). Для измерений уровней гемоглобина образцы CSF разводили в 40 раз.

Измерения уровней мРНК с помощью qRT-PCR.

Области головного мозга собирали и помещали в пробирки для защиты ткани с 1,5 мл реактива RNA-later (Qiagen, номер в каталоге 76514), которые были предварительно заполнены реактивом RNA-later - раствором, стабилизирующим РНК. Ткань в растворе RNA-later можно хранить при 4°C в течение 1 месяца или при -20°C или -80°C на неопределенный срок. Выделение РНК: Набор RNeasy Plus Mini Kit: РНК из мышиноного гиппокампа и коры головного мозга и выделяли с использованием набора RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, номер в каталоге 74134). Образцы ткани гомогенизировали в объеме 600 мкл или 1200 мкл RLT Plus буфера, содержащего 10 мкл/мл 2-меркаптоэтанола и 0,5% реактива Dх. 600 мкл буфера для лизиса использовали, если образец ткани имел массу <20 мг, 1200 мкл буфера для лизиса использовали для образцов ткани массой >20 мг. Для гомогенизации образец ткани переносили в 2,0 мл круглодонную пробирку Eppendorf Safe-Lock tube (Eppendorf, номер в каталоге 022600044), содержащую 600 мкл RLT Plus буфера (плюс 10 мкл/мл 2-меркаптоэтанола и 0,5% реактива Dх) и 5 мм шарики из нержавеющей стали (Qiagen, номер в каталоге 69989). Образцы гомогенизировали с применением инструмента Qiagen's TissueLyser II. Образцы обрабатывали в течение 2,0 мин при частоте 20 Гц, образцы поворачивали на 180° и обрабатывали в течение еще 2,0 мин при частоте 20 Гц. Образцы затем обрабатывали 2,0 мин при частоте 30 Гц, образцы поворачивали на 180° и обрабатывали в течение еще 2,0 мин при частоте 30 Гц. Более длительную гомогенизацию и/или гомогенизацию при более высокой частоте использовали, если обработка была не полной. 600 мкл лизата ткани затем переносили в центрифужную колонку gDNA Eliminator в 2,0 мл пробирку для сбора и образцы центрифугировали в течение 30 с при 10000g. Все стадии центрифугирования осуществляли при RT. Собирали фильтрат и добавляли и смешивали равный объем 70% этанола. 600 мкл переносили в центрифужную колонку RNeasy, помещенную в 2,0 мл пробирку для сбора, и образцы центрифугировали в течение 15 с при 10000g. Фильтрат сливали и оставшийся 600 мкл образец добавляли в центрифужную колонку. Центрифужные колонки центрифугировали и фильтрат сливали. Колонки промывали 700 мкл промывочного буфера RW1, центрифугировали в течение 15 с при 10000g и фильтрат сливали. Колонки затем промывали 2-раза 500 мкл буфера RPE, содержащего 4 объема этанола, как описано в протоколе к набору. Колонки вначале центрифугировали в течение 15 с при 10000g в случае первого промывания, а затем в течение 2,0 мин при 10000g в случае второго промывания. После второго промывания колонки центрифугировали однократно в течение 1,0 мин при 10000g в случае сухих мембран. Колонки затем переносили в новую 1,5 мл пробирку для сбора и 30 мкл не содержащей РНКаз воды добавляли непосредственно в центр мембраны. Обеспечивали возможность инкубирования мембран в течение 10 мин при RT. Затем колонки центрифугировали в течение 1,0 мин при 10000g для элюирования РНК. Элюат, содержащий РНК, собирали и хранили на льду до тех пор, пока можно будет концентрации РНК определить по спектральной поглощательной способности в УФ с применением спектрофотометра NanoDrop (Thermo). Образцы РНК хранили при -80°C. Выделение РНК: Набор RNEASY® Plus Universal Mini Kit: РНК из всех остальных образцов ткани яванского макака, мыши и крысы выделяли с использованием набора RNEASY® Plus Universal Mini Kit (Qiagen, номер в каталоге 73404). Для гомогенизации 50 мкг или меньшее количество образца ткани переносили в 2,0 мл круглодонную пробирку Eppendorf Safe-Lock tube (Eppendorf, номер в каталоге 022600044), содержащую 900 мкл реактива для лизиса QIAZOL® и 5 мм шарик из нержавеющей стали (Qiagen, номер в каталоге 69989). Образцы гомогенизировали с использованием инструмента Qiagen's TissueLyser II. Образцы обрабатывали в течение 2,0 мин при частоте 20 Гц, образцы поворачивали на 180° и обрабатывали в течение еще 2,0 мин при частоте 20 Гц. Образцы затем обрабатывали 2,0 мин при частоте 30 Гц, образцы переворачивали на 180° и обрабатывали в течение еще 2,0 мин при частоте 30 Гц. Более длительную гомогенизацию и/или гомогенизацию при более высокой частоте использовали, если обработка была не полной. Лизат гомогенизированной ткани затем переносили в новую 2,0 мл круглодонную пробирку Eppendorf Safe-Lock и оставляли при RT в течение 5,0 мин 100 мкл раствора gDNA Eliminator Solution добавляли в каждую пробирку и пробирки энергично встряхивали в течение 30 с. 180 мкл хлороформа (Sigma, номер в каталоге 496189) добавляли в каждую пробирку и пробирки энергично встряхивали в течение 30 с. Пробирки оставляли при RT в течение 3 мин. Центрифугировали пробирки при 12000g в течение 15 мин при 4°C. После центрифугирования верхнюю водную фазу переносили в новую 2,0 мл круглодонную пробирку Eppendorf Safe-Lock в объеме ~500 мкл. Добавляли и смешивали равный объем 70% этанола. Все будущие стадии центрифугирования осуществляли при RT. 500 мкл переносили в центрифужную колонку RNeasy, помещенную в 2,0 мл пробирку для сбора, и образцы центрифугировали в течение 15 с при 10000g. Фильтрат сливали и оставшийся 500 мкл образец добавляли в центрифужную колонку. Центрифужные колонки центрифугировали и фильтрат сливали и колонки промывали 700 мкл промывочного буфера RWT, содержащего 2 объема этанола. Колонки центрифугировали в течение 15 с при 10000g, фильтрат сливали. Колонки затем промывали дважды 500 мкл буфера RPE, содержащего 4 объе-

ма этанола, как описано в протоколе к набору. Колонки вначале центрифугировали в течение 15 с при 10000g в случае первого промывания, а затем в течение 2,0 мин при 10000g в случае второго промывания. После второго промывания колонки центрифугировали однократно в течение 1,0 мин при 10000g в случае сухих мембран. Колонки затем переносили в новую 1,5 мл пробирку для сбора и 30 мкл не содержащей РНКаз воды добавляли непосредственно в центр мембраны. Обеспечивали возможность инкубирования мембран в течение 10 мин при RT. Колонки центрифугировали в течение 1,0 мин. При 10000g для элюирования РНК. Элюаты, содержащие РНК, собирали и хранили на льду до определения концентрации РНК по спектральной поглотительной способности в УФ с применением спектрофотометра NanoDrop (Thermo). Образцы РНК хранили при -80°C.

Синтез кДНК посредством обратной транскрипции: 300 нг РНК разводили до конечного объема 10,8 мкл с использованием не содержащей нуклеаз воды (Invitrogen, номер в каталоге 10977-015) в микропланшете PCR-96-AB-C (Ахуген, номер в каталоге 321-65-051). Добавляли 6,0 мкл в каждую лунку с реакционной смесью 1, содержащей следующее: 2,0 мкл 50 мкМ произвольных последовательностей из десяти мономеров (Ambion, номер в каталоге AM5722G) и 4,0 мкл 1× смеси dNTP (Invitrogen, номер в каталоге 10297-018). Планшет запечатывали с использованием оптически прозрачной уплотнительной ленты (Applied Biosystems, номер в каталоге 4360954) и центрифугировали в течение 1,0 мин при 1000×g при RT. Затем планшет нагревали в течение 3,0 мин при 70°C с использованием 96-луночной термоциклирующей системы ПЦР Thermal Cycler GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Планшет затем полностью охлаждали на льду. Затем 3,25 мкл реакционной смеси 2 (содержащей 2 мкл 10×буфера для синтеза цепи, 1,0 мкл фермента обратной транскриптазы MMLV-RT в количестве 200 Ед./мкл (Ambion, номер в каталоге 2044) и 0,25 мкл ингибитора РНКазы в количестве 40 Ед./мкл (Ambion, номер в каталоге AM2682)) добавляли в каждую из лунок. Планшет запечатывали с использованием оптически прозрачной уплотнительной ленты и центрифугировали в течение 1,0 мин при 1000×g при RT. При использовании 96-луночного термоциклера планшет нагревали до 42°C в течение 60 мин с продолжением до 95°C в течение 10 мин. Затем планшеты охлаждали на льду. Планшеты кДНК хранили при -20°C до готовности к использованию для анализа методом ПЦР.

qPCR для амплификации и количественного определения экспрессии мРНК SNCA и GAPDH: кДНК разводили в 5 раз в не содержащей нуклеаз воде в микропланшете PCR-96-AB-C. 16 мкл раствора мастер-микса, состоящего из следующего: 10 мкл 2× Taqman Gene экспрессия Master Mix (Applied Biosystems, номер в каталоге 4369016), 1,0 мкл 20× набора праймеров-зондов Taqman (Applied Biosystems) и 5,0 мкл не содержащей нуклеаз воды добавляли в каждую лунку 384-луночного оптического планшета для ПЦР (Applied Biosystems, номер в каталоге 4483315). 4,0 мкл разведенной кДНК добавляли в каждую лунку 384-луночного оптического планшета для ПЦР. Планшет запечатывали с использованием оптически прозрачной уплотнительной ленты и центрифугировали в течение 1,0 мин при 1000×g при RT. ПЦР осуществляли на системе для ПЦР в реальном времени Applied Biosystems 700 HT Fast Real-Time PCR System с использованием следующих параметров в стандартном режиме: 50°C в течение 2,0 мин, 95°C в течение 10 мин. С последующими 40 циклами при 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 1,0 мин.

Наборы праймеров-зондов для qRT-PCR: Наборы праймеров-зондов от Applied Biosystems (Thermo Fisher) включали в себя следующее:

- человеческий альфа-синуклеин (номер в каталоге Hs01103383ml), меченый FAM;
- человеческий PROS1 (номер в каталоге HS00165590\_ml), меченый FAM;
- альфа-синуклеин яванского макака (номер в каталоге Mf02793033\_ml), меченый FAM;
- GAPDH яванского макака (номер в каталоге Mf04392546\_gl), меченый FAM;
- GAPDH яванского макака (номер в каталоге Mf04392546\_gl), меченый VTC, с ограниченной концентрацией праймера;
- крысиный альфа-синуклеин (номер в каталоге Rn01425141\_ml), меченый FAM;
- крысиный GAPDH (номер в каталоге Rn01775763-gl), меченый FAM;
- крысиный GAPDH (номер в каталоге 4352338E), меченый VTC, с ограниченной концентрацией праймера;
- мышинный GAPDH (номер в каталоге Mm99999915-gl), меченый FAM;
- мышинный GAPDH (номер в каталоге 4352339E), меченый VTC, с ограниченной концентрацией праймера.

Пример 5. Анализ активности и переносимости ASO-005459 *in vivo* у мышей.

ASO-005459 представляет собой ASO с модифицированной LNA, специфический в отношении человеческого SNCA. Результаты *in vitro* (описанные выше) демонстрируют, что ASO-005459 является активным и селективным в отношении снижения уровня мРНК SNCA в первичных нейронах. Результаты *in vitro* также говорят о том, что ASO-005459 хорошо переносится.

Мыши A53T-РАС.

Для оценки того, являются ли эти результаты истинными также и *in vivo*, 100 мкг ASO-005459 вводили мышам A53T-РАС посредством ICV инъекции, и переносимость, и нокдаун (KD) мРНК SNCA в гиппокампе оценивали через 3 суток после инъекции, как описано в примере 4 (выше).

Как показано в табл. 6 (ниже), ASO-005459 хорошо переносился, причем общая средняя оценка переносимости составляла 1. Кроме того, ASO-005459 существенно снижал уровни мРНК SNCA на >90% в гиппокампе через 3 суток после введения (фиг. 9).

Таблица 6  
Переносимость ASO-005459 у мышей A53T-PAС, 3-суточное исследование

№ животного	Гипер-активность	Настороженность	Координация движений и сила	Поза/дыхание	Тремор/конвульсии	Общая оценка
31	0	2	1	2	0	5
32	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0
среднее значение						1,00
SEM						1,00

Для оценки активности *in vivo* мышам A53T-PAС вводили дозы ASO-005459, составляющие 3,13 мкг, 12,5 мкг, 25 мкг или 50 мкг, посредством ICV инъекции. Переносимость оценивали посредством измерения масс тела через 7 и 14 суток после введения дозы. Экспрессию мРНК SNCA оценивали через 14 суток после введения дозы, когда животных умерщвляли и их ткани собирали. Нокдаун мРНК SNCA измеряли в трех областях головного мозга: гиппокамп, ствол головного мозга и полосатое тело. Ствол головного мозга и полосатое тело представляют собой две из области, которые являются наиболее пораженными в головном мозге у пациентов с MSA и PD. В отдельном исследовании мышам C57BL/6 вводили дозу 100 мкг ASO-005459 и переносимость оценивали посредством измерения массы тела животных через 7, 14, 21 и 28 суток после введения дозы. Дозу 100 мкг ASO-005459 вводили ICV мышам C57BL/6 дикого типа (WT) и массу тела и поведение отслеживали в течение 4-недельного периода. Поскольку ASO-005459 не оказывает целенаправленное воздействие на мышиный SNCA, снижение экспрессии мРНК SNCA не измеряли у этих животных. Как показано на фиг. 10A и 10B, отсутствовали значимые различия в массе тела у мышей (как мышей A53T-PAС, так и мышей C57BL/6), обработанных ASO-005459 (в случае всех концентраций), и мышей, обработанных контролем со средой. Животные (C57BL/6) не демонстрировали какого-либо ненормального поведения в течение периода проведения эксперимента. См. табл. 7 (ниже). Такие результаты демонстрируют, что ASO-005459 хорошо переносился. Кроме того, у мышей, получавших обработку ASO-005459, присутствовало значительное и дозозависимое снижение экспрессии мРНК SNCA во всех трех исследуемых областях головного мозга. См. фиг. 11A-11C. В гиппокампе экспрессия мРНК SNCA снижалась на 53%, 73%, 80% и 96% для 3,13, 12,5, 25 и 50 мкг ASO-005459, соответственно. Подобные дозозависимые нокдауны также наблюдали в стволе головного мозга. В полосатом теле нокдауны мРНК SNCA были более переменными и менее робастными по сравнению с другими областями (фиг. 11A-11C): 75% и 46% нокдаун наблюдали с 50 мкг и 25 мкг ASO-005459, соответственно. Тем не менее, при использовании 12,5 мкг и 3,13 мкг ASO-005459 отсутствовало значительное снижение экспрессии мРНК SNCA. Возможные объяснения более низкой активности, наблюдаемой в полосатом теле, могут быть обусловлены различиями в уровнях ASO или кинетике нокдауна мРНК SNCA.

Таблица 7  
Переносимость ASO-005459 в 28-суточном исследовании

№ животного	Момент времени (сутки)	Гипер-активн-ость	Насторо-женность	Коорди-нация движений и сила	Поза/ дыхание	Тремор/ конвульсии	Общая оценка
26	1	0	0	0	0	0	0
26	28	0	0	0	0	0	0
27	1	0	0	0	0	0	0
27	28	0	0	0	0	0	0
28	1	0	0	0	0	0	0
28	28	0	0	0	0	0	0
29	1	0	0	0	0	0	0
29	28	0	0	0	0	0	0
30	1	0	0	0	0	0	0
30	28	0	0	0	0	0	0

Уровни ASO-005459 измеряли во всех трех областях головного мозга мышей А53Т-РАС. Как показано на фиг. 12 и в табл. 8 (ниже), величины воздействия на головной мозг были примерно пропорциональными дозе и подобными во всех трех областях, в том числе в полосатом теле. Соотношения воздействия-ответа на ASO-005459 для различных областей головного мозга представлены на фиг. 13А-13Д. Подобные соотношения воздействия-ответа наблюдали в гиппокампе и стволе мозга с оцененными значениями  $IC_{50}$  179 и 206 нМ, соответственно. По сравнению с этим соотношение воздействия-ответа в полосатом теле было относительно завышенным, что говорит о более медленной кинетике снижения уровня мРНК SNCA в этой области. См., фиг. 13С.

Таблица 8  
Краткое изложение воздействия ASO-005459 на головной мозг в 14-суточном исследовании на А53Т-РАС

	Доза (мкг)	Среднее значение (нМ)	SD	Относительно гиппокампа
Гиппокамп	3,13	214	43	
	12,5	411	140	
	25	600	223	
	50	1916	807	
Ствол головного мозга	3,13	160	47	0,7
	12,5	266	47	0,6
	25	440	102	0,7
	50	707	202	0,4
Полосатое тело	3,13	212	38	1,0
	12,5	438	103	1,1
	25	586	109	1,0
	50	1332	302	0,7

Для получения более подробных данных по дозозависимому эффекту/динамике ASO-005459 вводили снова (0, 12,5, 25 или 50 мкг) непосредственно в желудочки головного мозга мышей А53Т-РАС посредством ручной ICV инъекции. Животных умерщвляли через 24 ч, 3 суток, 4, 8, 12, 16 и 20 недель после введения доз и оценивали экспрессию мРНК SNCA в стволе головного мозга и полосатом теле.

Как показано на фиг. 14А и 14В (и в соответствии с данными, представленными выше), введение ASO-005459 мышам А53Т-РАС приводило в результате к значительному снижению уровня экспрессии мРНК SNCA (по сравнению с контролем со средой) как в стволе головного мозга, так и в полосатом теле. Снижение оказывалось зависимым как от времени, так и от дозы, причем пиковое снижение (~90%) наблюдалось в стволе головного мозга при использовании дозы ASO-005459, составляющей 50 мкг, приблизительно через 4 недели после введения дозы (фиг. 14А). В полосатом теле пиковое снижение (~55%)

наблюдали при использовании дозы ASO-005459, составляющей 50 мкг, приблизительно через 3 суток после введения дозы (фиг. 14B). Уровни экспрессии мРНК SNCA оставались значительно сниженными по сравнению с контролем со средой через 4 недели после введения дозы (фиг. 15A и 15B) и возвращались к исходному уровню контроля приблизительно через 16 недель после введения дозы (фиг. 14A и 14B).

Как показано на фиг. 16A и 16B, введение ASO-005459 животным также приводило в результате к зависимому от времени и дозы снижению уровня белка SNCA как в тканях ствола головного мозга, так и полосатого тела. Пиковое снижение (~75%) наблюдали в стволе головного мозга при использовании дозы, составляющей 50 мкг, через 8 недель после введения дозы (фиг. 16A). Для ткани полосатого тела головного мозга пиковое снижение (~75%) также наблюдали при использовании дозы, составляющей 50 мкг, но через 4 недели после введения дозы (фиг. 16B). Уровни экспрессии для отдельных мышей через 8 недель после введения дозы представлены на фиг. 17A (ствол головного мозга) и 17B (полосатое тело). В то время как уровень белка SNCA возвращался близко к исходному уровню приблизительно через 12 недель после введения дозы в полосатом теле, уровень экспрессии был все еще значительно сниженным (~25%) в стволе головного мозга вплоть до 16 недель после введения дозы.

Пример 7. Анализ активности и переносимости оказывающих целенаправленное воздействие на SNCA антисмысловых олигонуклеотидов (ASO) *in vivo* у яванских макаков.

Для дополнительной оценки активности и переносимости ASO *in vivo* разработали модель на яванских макаках, имеющих интратекальный порт (Cyno IT). Эта модель обеспечивает возможность оценки опосредованного ASO-005459 нокдауна SNCA, а также нокдауна потенциальных нецелевых мишеней PROS1 и IKZF3 с несовпадением 1 пары оснований. Участки-мишени ASO-005459 в SNCA, PROS1 и IKZF3 являются полностью консервативными у человека и яванского макака.

Как описано выше в примере 3, каждому животному имплантировали интратекальный катетер для спинномозговой жидкости (CSF), входящий в позвонки L3 или L4. ASO (ASO-005459, ASO-005584 и ASO-005578) растворяли в солевом растворе и вводили животным в виде инфузии за 4,5 мин с использованием IT порта (2 животных на дозовую группу). Каждое из животных получало одно из следующего: (i) ASO-005578 (суммарная доза 4 мг), (ii) ASO-005584 (суммарная доза 4 или 8 мг) и (iii) ASO-005459 (суммарная доза 8 мг). Животных затем умерщвляли в различные моменты времени после введения дозы, когда ткани собирали для анализа воздействия и активности ASO. Анализируемые области головного мозга включали в себя продолговатый мозг (Med), варолиев мост (V-Pons), средний мозг (V-MB), мозжечок (CBL), дорсальный отдел полосатого тела (левый и правый) (СаiP), гиппокамп (левый и правый) (Hip), лобную долю коры головного мозга (левую и правую) (FrC), височную долю коры головного мозга (левую и правую) (TeC), теменную долю коры головного мозга (левую и правую) (PaC), затылочную долю коры головного мозга (левую и правую) (Oce) и белое вещество коры головного мозга (WM). Кроме того, собирали образцы спинного мозга в шейном (CSC), грудном (TSC) и поясничном (LSC) отделах. Образцы также собирали из печени, почки, сердца, ядер тройничного нерва, большеберцового нерва и аорты для оценки нецелевых фармакологических свойств в этих областях.

Как наблюдали у мышей, ASO хорошо переносились яванскими макаками без наблюдаемых неблагоприятных эффектов (данные не показаны). И как показано на фиг. 18A и таблице 9 ниже, введение ASO-005578 или ASO-005584 животным приводило в результате к значительному снижению уровней мРНК SNCA во всех анализируемых тканях головного мозга. Через 2 недели после введения дозы ASO-005578 индуцировал снижения на 75%, 32%, 65%, 69%, 98% и 87% в продолговатом мозге, дорсальном отделе полосатого тела, варолиевом мосту, мозжечке, поясничном отделе спинного мозга и лобной доле коры головного мозга, соответственно. ASO-005584 индуцировал снижения на 59%, 45%, 61%, 57%, 97% и 88% в продолговатом мозге, дорсальном отделе полосатого тела, варолиевом мосту, мозжечке, поясничном отделе спинного мозга и лобной доле коры головного мозга, соответственно. Подобные снижения наблюдали в моменты времени через 2 недели и 4 недели после введения дозы ASO-005584, составляющей 8 мг (фиг. 18B). ASO-005459 также демонстрировал робастный нокдаун мРНК SNCA в различных участках мозга яванского макака (табл. 9).

Таблица 9  
Воздействие ASO на уровни мРНК SNCA в головном мозге яванского макака

ASO №	Доза (мг)	Момент времени (недели)	Med	CBL	FrC	PaC	CauP	TeC	Occ	Hip	V-MB	V-Pons	CSC	TSC	LSC	WM
ASO-005578	4	2	25	32	13	27	68	24	38	45	27	35	15	7	2	64
ASO-005584	4	2	41	44	12	34	55	8	38	44	53	39	16	9	3	45
	8	2	21	62	10	16	62	6	19	36	34	23	2	2	2	38
	8	4	36	70	11	23	65	7	28	48	48	37	5	4	3	78
ASO-005459	8	24 часа	174	140	146		149					137				73
	8	24 часа	129	108	138		133					145				90
	8	3 суток	162	69	69		112					62				19
	8	3 суток	127	67	72		114					87				31
	2	2	133	140	109		161					104				21
	2	2	117	127	100		126					180				111
	4	2	62	86	22		116					49				4
	4	2	81	72	50		145					97				13
	8	2	31	97	7		124					66				14
	8	2	30	38	15	26	75	12	29	29	86	29	13	6	2	79
	8	4	26	50	4	12	53	3	13	9	24	21	4	6	4	87
	8	4	38	61	9		120					30				10
	8	8	121	85	40		98					78				5
	8	8	93	52	14		61					36				11
	8	13	30	63	8		81					27				1
	8	13	25	28	8		49					22				1
	8	20	40	38	35		76					63				9
	8	20	22	52	35		76					26				11

Для дополнительной характеристики вышеописанного зависимого от времени снижения уровня мРНК SNCA яванским макакам вводили дозу ASO-005459 (суммарная доза 8 мг на животное) и умерщвляли через 24 ч, 3 суток, 2, 4, 8, 13 или 20 недель после введения дозы для оценки уровня экспрессии мРНК SNCA в различных тканях. Как показано на фиг. 19А, пиковое снижение наблюдали через 2 недели и 13 недель после введения дозы. Пиковые снижения на 70, 65, 75, 35, 94 и 99% наблюдали в продолговатом мозге, мозжечке, варолиевом мосту, дорсальном отделе полосатого тела, лобной доле коры головного мозга и поясничном отделе спинного мозга, соответственно. Это снижение уровня экспрессии мРНК SNCA также коррелировало с зависимым от времени снижением уровня экспрессии белка SNCA

(фиг. 19B).

Затем для дополнительной оценки того, являлось ли снижение уровня экспрессии у яванских макаков зависимым также и от дозы, животные получали 2, 4 или 8 мг ASO-005459, а затем их умерщвляли через 2 недели после введения дозы. Как показано на фиг. 20A и 20B, снижение уровней экспрессии как мРНК SNCA, так и белка SNCA также являлось зависимым от дозы, причем наибольшее снижение наблюдали при использовании 8 мг ASO-005459. Результаты, представленные в данном документе, демонстрируют, что ASO-005459 является активным и селективным в отношении снижения уровня мРНК SNCA, и что ASO-005459 хорошо переносится в нейронах и в доклинических исследованиях на видах животных *in vivo*. Более того, результаты от нейронов A53T-РАС подтверждают, что опосредованные ASO-005459 снижения уровней мРНК приводят в результате к снижению уровней белка SNCA *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, результаты у мышей A53T-РАС и яванских макаков демонстрируют, что ASO-005459 снижает уровни мРНК SNCA и белка SNCA в головном мозге в дозах, которые хорошо переносятся. В совокупности эти результаты обосновывают продолжающуюся разработку ASO-005459 в качестве модифицирующего заболевание терапевтического средства для лечения синуклеопатий.

Согласно настоящей РСТ заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/616994, поданной 12 января 2018 года, которая тем самым включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антисмысловой олигонуклеотид для лечения синуклеопатии, содержащий непрерывную нуклеотидную последовательность длиной 10-30 нуклеотидов и содержащий последовательность, как изложено в:

- (i) SEQ ID NO: 7;
- (ii) SEQ ID NO: 4;
- (iii) SEQ ID NO: 5;
- (iv) SEQ ID NO: 6;
- (v) SEQ ID NO: 8;
- (vi) SEQ ID NO: 9;
- (vii) SEQ ID NO: 10;
- (viii) SEQ ID NO: 11;
- (ix) SEQ ID NO: 12;
- (x) SEQ ID NO: 13;
- (xi) SEQ ID NO: 14;
- (xii) SEQ ID NO: 16;
- (xiii) SEQ ID NO: 17;
- (xiv) SEQ ID NO: 18;
- (xv) SEQ ID NO: 19;
- (xvi) SEQ ID NO: 20;
- (xvii) SEQ ID NO: 21;

и причем антисмысловой олигонуклеотид представляет собой гэтмер с чередующимися нуклеотидами во фланкирующих участках.

2. Антисмысловой олигонуклеотид по п.1, причем антисмысловой олигонуклеотид является способным к ингибированию экспрессии транскрипта человеческого SNCA в клетке, которая экспрессирует транскрипт человеческого SNCA.

3. Антисмысловой олигонуклеотид по п.2, причем транскрипт человеческого SNCA содержит нуклеотидную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 1.

4. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп.1-3, причем гэтмер с чередующимися нуклеотидами во фланкирующих участках содержит нуклеотидный аналог, представляющий собой нуклеозид с модифицированным сахаром.

5. Антисмысловой олигонуклеотид по п.4, причем нуклеозид с модифицированным сахаром представляет собой усиливающий аффинность нуклеозид с модифицированным сахаром.

6. Антисмысловой олигонуклеотид по п.4 или 5, который содержит по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять или по меньшей мере десять нуклеотидных аналогов.

7. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп.4-6, причем

(i) нуклеозид с модифицированным сахаром выбран из группы, состоящей из закрытой нуклеиновой кислоты (LNA); 2'-О-алкил-РНК; 2'-амино-ДНК; 2'-фтор-ДНК; арабинонуклеиновой кислоты (ANA); 2'-фтор-ANA, гекситолнуклеиновой кислоты (HNA), интеркалирующей нуклеиновой кислоты (INA), конформационно затрудненного этилового аналога нуклеозида (cEt), 2'-О-метил-нуклеиновой кислоты (2'-ОМЕ), 2'-О-метоксиэтил нуклеиновой кислоты (2'-МОЕ) и любой их комбинации; или

- (ii) нуклеозид с модифицированным сахаром содержит бициклический сахар.
8. Антисмысловой олигонуклеотид по п.7, причем бициклический сахар содержит сEt, 2',4'-стерически затрудненный 2'-O-метоксиэтил (сМОЕ), LNA,  $\alpha$ -L-LNA, P-D-LNA, 2'-O,4'-C-этилен-мостиговые нуклеиновые кислоты (ENA), amino-LNA, окси-LNA или тио-LNA.
9. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп.1-8, причем непрерывная нуклеотидная последовательность содержит одно или несколько 5'-метилцитозиновых нуклеотидных оснований.
10. Антисмысловой олигонуклеотид по п.7, который содержит:
- (i) от двух до пяти LNA на 5'-участке антисмыслового олигонуклеотида; или
- (ii) от двух до пяти LNA на 3'-участке антисмыслового олигонуклеотида.
11. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп.1-10, причем непрерывная нуклеотидная последовательность содержит последовательность, изложенную в:
- (i) SEQ ID NO: 7 со схемой AttCctttacaccAcACT (ASO-005578), AttCctttacaccAcACT (ASO-005584), AttCctttacaccaCACT (ASO-005597) или AttCctttacaccacACT (ASO-005611);
- (ii) SEQ ID NO: 9 со схемой AatTCctttacaccacACT (ASO-005717) или AAttCctttacaccaCACT (ASO-005700);
- (iii) SEQ ID NO: 12 со схемой ttccTttacaccacac (ASO-288906), ttCctttacaccAcAc (ASO-287957), TtcctttacaccaCaC (ASO-287959) или ttCctttacaccACac (ASO-287962); или
- (iv) SEQ ID NO: 14 со схемой AAttcctttacACCAcAC (ASO-005650), AAttCctttacacCaCAC (ASO-005496) или AAttCCtTtaccacacAC (ASO-005392); причем заглавная буква представляет собой нуклеозид с модифицированным сахаром, и строчная буква представляет собой ДНК.
12. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп.1-11, который содержит межнуклеозидный мостик, выбранный из: фосфодиэфирного мостика, фосфотриэфирного мостика, метилфосфонатного мостика, фосфорамидатного мостика, фосфоротиоатного мостика и их комбинаций.
13. Антисмысловой олигонуклеотид по п.12, причем межнуклеозидный мостик содержит один или несколько определяемых стереохимической структурой модифицированных фосфатных мостиков.
14. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп.1-13, причем антисмысловой олигонуклеотид является ковалентно прикрепленным по меньшей мере к одному нуклеотидному фрагменту или фрагменту, отличному от полинуклеотида.
15. Антисмысловой олигонуклеотид по п.14, причем нуклеотидный фрагмент или фрагмент, отличный от полинуклеотида, содержит белок, цепь жирной кислоты, сахарный остаток, гликопротеин, белок или любые их комбинации.
16. Фармацевтическая композиция, содержащая антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп.1-15 и фармацевтически приемлемый носитель.
17. Композиция по п.16, которая дополнительно содержит терапевтическое средство.
18. Композиция по п.17, причем терапевтическое средство представляет собой антагонист альфа-синуклеина.
19. Композиция по п.18, причем антагонист альфа-синуклеина представляет собой антитело к альфа-синуклеину или его фрагмент.
20. Набор для лечения синуклеопатии, содержащий антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп.1-15 или композицию по любому из пп.16-19 и инструкции по применению.
21. Способ ингибирования или снижения экспрессии мРНК SNCA или экспрессии белка SNCA в клетке, причем способ предусматривает обеспечение контакта клетки, экспрессирующей мРНК SNCA или белок SNCA, с антисмысловым олигонуклеотидом по любому из пп.1-15 или композицией по любому из пп.16-19, причем экспрессия мРНК SNCA или экспрессия белка SNCA в клетке ингибируется или снижается после такого контакта.
22. Способ по п.21, причем клетка представляет собой нейрон.
23. Способ лечения синуклеопатии у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий введение субъекту эффективного количества антисмыслового олигонуклеотида по любому из пп.1-15 или композиции по любому из пп.16-19.
24. Способ по п.21, причем субъект представляет собой человека, и причем синуклеопатия является выбранной из группы, состоящей из болезни Паркинсона, деменции при болезни Паркинсона (PDD), мультисистемной атрофии, деменции с тельцами Леви и любых их комбинаций.
25. Применение антисмыслового олигонуклеотида по любому из пп.1-15 для лечения синуклеопатии у субъекта, нуждающегося в этом.
26. Применение по п.25, причем субъект представляет собой человека, и причем синуклеопатия является выбранной из группы, состоящей из болезни Паркинсона, деменции при болезни Паркинсона (PDD), мультисистемной атрофии, деменции с тельцами Леви и любых их комбинаций.
27. Применение композиции по любому из пп.16-19 для лечения синуклеопатии у субъекта, нуждающегося в этом.
28. Применение по п.27, причем субъект представляет собой человека, и причем синуклеопатия является выбранной из группы, состоящей из болезни Паркинсона, деменции при болезни Паркинсона (PDD), мультисистемной атрофии, деменции с тельцами Леви и любых их комбинаций.

```

6001 gagatagggg cgaggagcac gctgcagggg aagcagcggg cgcggggaga ggggcgggca
6061 gaagcgctga caaatcagcg gtggggggcg agagccgagg agaaggagaa ggaggaggac
6121 taggaggagg aggacggcga cgaccagaag gggcccaaga gagggggcga gcgaccgagc
6181 gccgcgacgc ggaagtgagg tgcgtgcggg ctgcagcgcg gcccccggcc cggcccctcc
6241 gagagcgtec tgggcgctcc ctcaagcctt gccttcaagc cttctgcctt tccaccctcg
6301 tgagcggaga actgggagtg gccattcgac gacaggttag cgggtttgcc tcccactccc
6361 ccagcctcgc gtgcgccgct cacagcggcc tctctgggg acagtcccc ccgggtgccg
6421 cctccgcect tctgtgcgc tcttttctt tcttcttcc tattaatat tatttgggaa
6481 ttgtttaaat tttttttta aaaaaagaga gaggcgggga ggagtcggag ttglggagaa
6541 gcagagggac tcaggtaagt acctgtggat ctaaaccggc gtctttggaa atcctggaga
6601 acgcccgatg ggagacgaat ggtcgtgggc accgggaggg ggtggtgctg ccatgaggac
6661 ccgctgggcc aggtctctgg gaggtgagta cttgtccctt tggggagcct aaggaaagag
6721 acttgacctg gctttcgtcc tcttctgat attcccttct ccacaagggc tgagagatta
6781 ggctgcttct ccgggatccg ctttccccg ggaaacgcga ggatgctcca tggagcgtga
6841 gcatccaact tttctctcac ataaaatctg tctgccgct ctcttggttt ttctctgtaa
6901 agtaagcaag ctgcgtttgg caaataatga aatggaagtg caaggaggcc aagtcaacag
6961 gtggtaacgg gttaacaagt gctggcggcg ggtccgctag ggtggaggct gagaaccgcc
7021 cctcgggtgg ctggcggggg gttggagacg gcccgcgagt gtgagcggcg cctgctcagg
7081 gtagatagct gagggcgggg gtggatgttg gatggattag aaccatcaca cttgggcectg
7141 ctgtttgect gagtttgaac cacacccoga gtgagcagtt agttctgttg cctacgcctt
7201 tccaccatca acctgttagc cttctctgg gattcatgtt aaggataccc ctgaccctaa
7261 gectccagct tccatgcttc taactcatac tgttaccctt tagaccccg gaalltaaaa
7321 aaggggttaa tcttttcatg caactccact tctgaaatgc agtaataaca actcagagga
7381 ttcatcctaa tccgtggtta ggtggctaga cttttactag ccaagatgga tgggagatgc
7441 taaattttta atgccagagc taaaaatgtc tgccttgtcc aatggttaaa tgagtgtaca
7501 cttaaaagag tctcacactt tggagggttt ctcatgattt ttcagtgttt tttgtttatt
7561 tttcccgaa agttctcatt caaagtgtat tttatgtttt ccagtgtggt gtaaaggaat
7621 tcattagcca tggatgtatt catgaaagga ctttcaaagg ccaaggaggg agttgtggct
7681 gctgctgaga aaaccaaaca ggggtggcga gaagcagcag gaaagacaaa agaggggtgtt
7741 ctctatgtag gtaggtaaac cccaaatgtc agtttgggtc ttgttcatga gtgatgggtt
7801 aggataatca atactctaaa tgcgtgtagt tctctctctt gattcatttt tgcacattg
7861 cttgtcaaaa aggtggactg agtcagaggt atgtgtaggt aggtgaatgt gaacgtgtgt
7921 atttgagcta atagtaaaaa atgcgactgt ttgcttttcc agatttttaa ttttgcccta
7981 atatttatga ctttttaaaa atgaatgttt ctgtacctac ataattctat ttcagagaac
8041 agtttttaaaa actcatagtc ttttaaaaaa taatcaagaa tattcttaag aatcaaaatc
8101 attgatggat ctgtgatttc tttaccatc atgaaaaatg tttgtcaatt ttaatccatt
8161 ctgattttta aaatatgact ttgatatgcc cctgtgatgt gtataaagag acctatttgt
8221 ggccctaaaa tggaaagaac agattagtct ttgatagagt tacttcatgt gatcatttgg
8281 tctctgtgaa cactgaggac agagaaaagt gcttgagggc tgctactaat ctctcagaaa
8341 catttgtata gttcatccat caaatgacac acatactaaa agaataaaga aattgatgct

```

8400

Фиг. 1А

1 aggagaagga gaaggaggag gactaggagg aggaggacgg cgacgaccag aaggggcccc  
 61 agagaggggg cgagcgaccg agcgccgcga cggggaagtg aggtgctgctc gggctgcagc  
 121 gcagaccccc gcccgcccc tccgagagcg tccctgggccc tccctcacgc cttgccttca  
 181 agccttctgc ctttccacc tegtgagcgg agaactggga gtggccattc gacgacagtg  
 241 tgggtgtaaag gaattcatta gccatggatg tattcatgaa aggactttca aaggccaagg  
 301 agggagtgtg ggctgctgct gagaaaacca aacaggggtg ggcagaagca gcaggaaaga  
 361 caaaagaggg tgttctctat gtaggctcca aaaccaagga gggagtgggt catggtgtgg  
 421 caacagtggc tgagaagacc aaagagcaag tgacaaatgt tggaggagca gtggtgacgg  
 481 gtgtgacagc agtagccagc aagacagtgg agggagcagg gagcattgca gcagccactg  
 541 gctttgtcaa aaaggaccag ttgggcaaga atgaagaagg agccccacag gaaggaattc  
 601 tgggaagatat gcctgtggat cctgacaatg aggettatga aatgccttct gaggaagggt  
 661 atcaagacta cgaacctgaa gcctaagaaa tatctttgct cccagtttct tgagatctgc  
 721 tgacagatgt tccatcctgt acaagtgtc agttccaatg tgcccagtc tgacatttct  
 781 caaagttttt acagtgtatc tcgaagtctt ccatcagcag tgattgaagt atctgtacct  
 841 gccccactc agcatttcgg tgcctccctt tcaactgaagt gaatacatgg tagcagggtc  
 901 tttgtgtgct gtggattttg tggcttcaat ctacgatggt aaaacaaatt aaaaacact  
 961 aagtgactac cacttatttc taaatcctca ctattttttt gttgctgttg ttcagaagtt  
 1021 gttagtgatt tgctatcata tattataaga tttttagggtg tcttttaatg atactgtcta  
 1081 agaataatga cgtattgtga aatttggtta tatatataat acttaaaaat atgtgagcat  
 1141 gaaactatgc acctataaat actaaatatg aaattttacc attttgcgat gtgttttatt  
 1201 cacttgtgtt tgtatataaa tgggtgagaat taaaataaaa cgttatctca ttgcaaaaat  
 1261 attttatttt tatcccatct cactttaata ataaaaatca tgcttataag caacatgaat  
 1321 taagaactga cacaaggac aaaaatataa agttattaat agccatttga agaaggagga  
 1381 attttagaag aggtagagaa aatggaacat taacctaca ctcggaattc cctgaagcaa  
 1441 cactgccaga agtgtgtttt ggtatgcact ggttccttaa gtggctgtga ttaattattg  
 1501 aaagtggggg gttgaagacc ccaactacta ttgtagagtg gtcattttct ccttcaatc  
 1561 ctgtcaatgt ttgctttacg tttttgggg aactgttgtt tgatgtgat gtgtttataa  
 1621 ttgttataca tttttaattg agccttttat taacatata tgttattttt gtctogaaat  
 1681 aattttttag ttaaaatcta ttttgtctga tattgggtgtg aatgctgtac ctttctgaca  
 1741 ataaataata ttcgaccatg aataaaaaaa aaaaaaaagl gggttcccgg gaactaagca  
 1801 gtgtagaaga tgattttgac tacacctctc ttagagagcc ataagacaca ttagcacata  
 1861 ttagcacatt caaggetctg agagaatgtg gtttaactttg ttaactcag cattcctcac  
 1921 tttttttttt taatcatcag aaattctctc tctctctctc tctttttctc tcgctctctt  
 1981 tttttttttt tttttacagg aatgcctttt aaacatcgtt ggaactacca gagtcacctt  
 2041 aaaggagatc aattctctag actgataaaa atttcatggc ctccctttaa tggtgcaaaa  
 2101 tatatgaatt ctaggatttt tccctaggaa aggtttttct ctttcaggga agatctatta  
 2161 actccccatg ggtgetgaaa ataaacttga tggtgaaaaa ctctgtataa attaatttaa  
 2221 aaattatttg gtttctcttt ttaattatc tggggcatag tcatttctaa aagtcactag  
 2281 tagaaagtat aatttcaaga cagaatattc tagacatgct agcagtttat atgtattcat  
 2341 gagtaatgtg atatatattg ggcgctgggt aggaaggaag gaggaatgag tgactataag  
 2401 gatggttacc atagaaactt ccttttttac ctaattgaag agagactact acagagtgct  
 2461 aagctgcatg tgcactctta cactagagag aatgggtaag tttcttgttt tatttaagtt  
 2521 atgtttaagc aaggaaagga tttgttattg aacagtatat ttcaggaagg ttagaaagtg  
 2581 gcggttagga tatattttaa atctacctaa agcagcatat tttaaaaatt taaaagtatt  
 2641 ggtattaaat taagaaatag aggacagaac tagactgata gcagtgcct agaacaattt  
 2701 gagattagga aagttgtgac catgaattta aggatttatg tggatacaaa ttctccttta  
 2761 aagtgtttct tcccttaata tttatctgac ggtaattttt gagcagtgaa ttactttata  
 2821 tatcttaata gtttatttgg gaccaaaacac ttaaacaaaa agttctttaa gtcataatag  
 2881 ccttttcagg aagcttgtct catattcact cccgagacat tcacctgcca agtggcctga  
 2941 ggatcaatcc agtcctaggt ttatttttgc gacttacatt ctcccagtt attcagcctc  
 3001 atatgactcc acggctggct ttaccaaaac agttcagagt gcactttggc acacaattgg  
 3061 gaacagaaca atctaagtgt tggtttggta ttccaagtgg ggtctttttc agaatctctg  
 3121 cactagtgtg agatgcaaac atgtttctct atctttctgg cttatccagt atgtagctat  
 3181 ttgtgacata ataaatatat acatatatga aaata

Фиг. 1В

MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAEAAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVATVAEKTKEQVTNVGGAV  
 VTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEP EA  
 Фиг. 1С

Seque nce ID No.	Начало NG_011 851.1	Конец NG_011 851.1	Начало NG_00 0345.3	Конец NM_00 0345.3	DES No.	ASO со схемой	ASO No.	ASO с химической структурой
4	7,602	7,617	236	251	DES-001464	CCtttacaccacTG	ASO-001464	OxyMCs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyTs OxyG
4	7,602	7,617	236	251	DES-001649	CCTtacaccacacTG	ASO-001649	OxyMCs OxyMCs OxyTs DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyTs OxyG
6	7,602	7,621	236	255	DES-002030	AATCctttacaccacACT G	ASO-002030	OxyAs OxyAs OxyTs OxyTs DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyTs OxyG
5	7,602	7,619	236	253	DES-002031	TCctttacaccacaCTG	ASO-002031	OxyTs OxyTs DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyTs OxyG
5	7,602	7,619	236	253	DES-002032	TTCCtttacaccaCACTG	ASO-002032	OxyTs OxyTs OxyMCs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMCs OxyTs OxyG
6	7,602	7,621	236	255	DES-002040	AATTCctttacaccaCAC TG	ASO-002040	OxyAs OxyAs OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMCs OxyTs OxyG
5	7,602	7,619	236	253	DES-002041	TCctttacaccacacTG	ASO-002041	OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyTs OxyG
5	7,602	7,619	236	253	DES-002042	TTCCtttacaccacaCTG	ASO-002042	OxyTs OxyTs OxyMCs OxyMCs OxyTs DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyTs OxyG
6	7,602	7,621	236	255	DES-002050	AATcctttacaccacACT G	ASO-002050	OxyAs OxyAs OxyTs DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyTs OxyG
5	7,602	7,619	236	253	DES-002051	TTCCtttacaccacacTG	ASO-002051	OxyTs OxyTs OxyMCs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyTs OxyG
5	7,602	7,619	236	253	DES-002052	TTCCtttacaccaCACTG	ASO-002052	OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMCs OxyTs OxyG
6	7,602	7,621	236	255	DES-002060	AATCctttacaccacaCT G	ASO-002060	OxyAs OxyAs OxyTs OxyTs DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyTs OxyG
5	7,602	7,619	236	253	DES-002061	TCctttacaccacaCTG	ASO-002061	OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyTs OxyG
6	7,602	7,621	236	255	DES-002069	AATcctttacaccaCACT G	ASO-002069	OxyAs OxyAs OxyTs DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMCs OxyTs OxyG

5	7,602	7,619	236	253	DES-002070	TTCctttacaccacaCTG	ASO-002070	OxyTs OxyTs OxyMCs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs DNACs DNACs DNAAs DNACs OxyMCs OxyTs OxyG
6	7,602	7,621	236	255	DES-002078	AATTCctttacaccacaCTG	ASO-002078	OxyAs OxyAs OxyTs OxyTs OxyMCs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs DNACs DNAAs DNACs OxyMCs OxyTs OxyG
5	7,602	7,619	236	253	DES-002079	TTCctttacaccacACTG	ASO-002079	OxyTs OxyTs OxyMCs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs DNACs DNACs DNAAs DNACs OxyAs OxyMCs OxyTs OxyG
6	7,602	7,621	236	255	DES-002087	AATTCctttacaccacACTG	ASO-002087	OxyAs OxyAs OxyTs OxyTs DNACs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs DNACs DNACs OxyMCs OxyAs OxyMCs OxyTs OxyG
5	7,602	7,619	236	253	DES-002088	TTCctttacaccacACTG	ASO-002088	OxyTs OxyTs OxyMCs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs DNACs DNACs DNAAs DNACs OxyAs OxyMCs OxyTs OxyG
6	7,602	7,621	236	255	DES-002096	AATCctttacaccacaCTG	ASO-002096	OxyAs OxyAs OxyTs DNAts DNACs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs DNACs DNAAs DNACs OxyMCs OxyTs OxyG
6	7,602	7,621	236	255	DES-002097	AATTCctttacaccacACTG	ASO-002097	OxyAs OxyAs OxyTs OxyTs OxyMCs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs DNACs DNACs DNAAs DNACs OxyAs OxyMCs
								OxyTs OxyG
5	7,602	7,619	236	253	DES-002098	TTCCTttacaccacACTG	ASO-002098	OxyTs OxyTs OxyMCs OxyMCs OxyTs DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs DNACs DNACs DNAAs DNACs OxyAs OxyMCs OxyTs OxyG
4	7,602	7,617	236	251	DES-002780	CTttacaccacaCTG	ASO-002780	OxyMCs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs DNACs DNACs DNAAs DNACs OxyMCs OxyTs OxyG
8	7,603	7,618	237	252	DES-001435	TCctttacaccacaCT	ASO-001435	OxyTs OxyMCs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs DNACs DNACs DNACs DNAAs DNACs OxyMCs OxyT
8	7,603	7,618	237	252	DES-001490	TCctttacaccacaCT	ASO-001490	OxyTs OxyMCs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs DNACs DNACs DNACs DNAAs DNACs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-002755	ATtcctttacaccacACT	ASO-002755	OxyAs OxyTs DNAts DNACs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs DNACs DNACs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005559	AttCctttacaCcAcaCT	ASO-005559	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs OxyMCs DNACs OxyAs DNACs DNAAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005560	AttCctttacaCcAcaCT	ASO-005560	OxyAs DNAts DNAts DNACs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs OxyMCs DNACs OxyAs DNACs DNAAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005561	AttCctttacaCcAcACT	ASO-005561	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs OxyMCs DNACs DNAAs DNACs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005562	AttCctttacaCcAcACT	ASO-005562	OxyAs DNAts DNAts DNACs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs OxyMCs DNACs DNAAs DNACs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005563	AttCctttacaCcacaCT	ASO-005563	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs OxyMCs DNACs DNAAs DNACs DNAAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005564	AttCctttacaCcacaCT	ASO-005564	OxyAs DNAts DNAts DNACs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs OxyMCs DNACs DNAAs DNACs DNAAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005565	AttcctttacacCAcaCT	ASO-005565	OxyAs DNAts DNAts DNACs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs DNACs OxyMCs OxyAs DNACs DNAAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005566	AttccTttacacCaCaCT	ASO-005566	OxyAs DNAts DNAts DNACs DNACs OxyTs DNAts DNAts DNAAs DNACs DNAAs DNACs OxyMCs DNAAs OxyMCs DNAAs OxyMCs OxyT

7	7,603	7,620	237	254	DES-005567	AttcctttacacCaCaCT	ASO-005567	OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs OxyMCs DNAs OxyMCs DNAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005568	AttCcTttacacCacACT	ASO-005568	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs OxyTs DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005569	AttCctttacacCacACT	ASO-005569	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs OxyMCs DNAs DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005570	AttcCtttacacCacACT	ASO-005570	OxyAs DNAts DNAts DNacs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005571	AttccTttacacCacACT	ASO-005571	OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs OxyTs DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005572	AttCcTttacacCacaCT	ASO-005572	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs OxyTs DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005573	AttCctttacacCacaCT	ASO-005573	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005574	AttcCtttacacCacaCT	ASO-005574	OxyAs DNAts DNAts DNacs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005575	AttccTttacacCacaCT	ASO-005575	OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs OxyTs DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005576	AttCctttacaccAcCaCT	ASO-005576	OxyAs DNAts OxyTs OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs OxyAs OxyMCs DNAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005577	AttCcTttacaccAcCaCT	ASO-005577	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs OxyTs DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs OxyAs OxyMCs DNAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005578	AttCctttacaccAcCaCT	ASO-005578	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs OxyAs OxyMCs DNAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005579	AttcCtttacaccAcCaCT	ASO-005579	OxyAs DNAts DNAts DNacs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs OxyAs OxyMCs DNAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005580	AttcctttacaccAcCaCT	ASO-005580	OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs OxyAs OxyMCs DNAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005581	AttcctttacaccAcACT	ASO-005581	OxyAs OxyTs DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005582	AttCctttacaccAcACT	ASO-005582	OxyAs DNAts OxyTs OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005583	AttCcTttacaccAcACT	ASO-005583	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs OxyTs DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005584	AttCctttacaccAcACT	ASO-005584	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005585	AttcCtttacaccAcACT	ASO-005585	OxyAs DNAts DNAts DNacs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005586	AttcctttacaccAcACT	ASO-005586	OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005587	AttCctttacaccAcACT	ASO-005587	OxyAs OxyTs DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs OxyAs DNacs DNAs DNAs OxyMCs OxyT

7	7,603	7,620	237	254	DES-005588	ATtcctttacaccAcaCT	ASO-005588	OxyAs OxyTs DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005589	ATCctttacaccAcaCT	ASO-005589	OxyAs DNats OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005590	AtTcctttacaccAcaCT	ASO-005590	OxyAs DNats OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005591	AttCcTttacaccAcaCT	ASO-005591	OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs OxyTs DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005592	AttCctttacaccAcaCT	ASO-005592	OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005593	AttcCTttacaccAcaCT	ASO-005593	OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs OxyTs DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005594	AttcCtttacaccAcaCT	ASO-005594	OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005595	AttcctttacaccAcaCT	ASO-005595	OxyAs DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005596	ATcctttacaccaCACT	ASO-005596	OxyAs DNats OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005597	AttCctttacaccaCACT	ASO-005597	OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005598	AttcctttacaccaCACT	ASO-005598	OxyAs DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005599	ATCctttacaccaCaCT	ASO-005599	OxyAs DNats OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005600	AttCcTttacaccaCaCT	ASO-005600	OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs OxyTs DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005601	AttCctTtacaccaCaCT	ASO-005601	OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005602	AttCctttacaccaCaCT	ASO-005602	OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005603	AttcCtTtacaccaCaCT	ASO-005603	OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs DNats OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005604	AttcCtttacaccaCaCT	ASO-005604	OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005605	AttcctttacaccaCaCT	ASO-005605	OxyAs DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005606	ATcCctttacaccacACT	ASO-005606	OxyAs OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005607	ATCctTtacaccacACT	ASO-005607	OxyAs DNats OxyTs OxyMCs DNacs DNats OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005608	ATCctttacaccacACT	ASO-005608	OxyAs DNats OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT

7	7,603	7,620	237	254	DES-005609	AttCcTttaccaccACT	ASO-005609	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs OxyTs DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005610	AttCctTtaccaccACT	ASO-005610	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts OxyTs DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005611	AttCctttaccaccACT	ASO-005611	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005612	AttcCTtaccaccACT	ASO-005612	OxyAs DNAts DNAts DNacs OxyMCs OxyTs DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005613	AttcCtTtaccaccACT	ASO-005613	OxyAs DNAts DNAts DNacs OxyMCs DNAts OxyTs DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005614	AttcctttaccaccACT	ASO-005614	OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005615	ATtCctttaccaccACT	ASO-005615	OxyAs OxyTs DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005616	ATtctttaccaccACT	ASO-005616	OxyAs OxyTs DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005617	ATtCcTtaccaccACT	ASO-005617	OxyAs DNAts OxyTs OxyMCs DNacs OxyTs DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005618	ATtCctTtaccaccACT	ASO-005618	OxyAs DNAts OxyTs OxyMCs DNacs DNAts OxyTs DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005619	AttCctttaccaccACT	ASO-005619	OxyAs DNAts OxyTs OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005620	AttCcTtaccaccACT	ASO-005620	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs OxyTs OxyTs DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005621	AttCcTtaccaccACT	ASO-005621	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs OxyTs DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005622	AttCctTtaccaccACT	ASO-005622	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts OxyTs DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005623	AttCctttaccaccACT	ASO-005623	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005624	AttcCTtaccaccACT	ASO-005624	OxyAs DNAts DNAts DNacs OxyMCs OxyTs DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005625	AttcCtTtaccaccACT	ASO-005625	OxyAs DNAts DNAts DNacs OxyMCs DNAts OxyTs DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
11	7,603	7,619	237	253	DES-005626	TtCctttacAcCaCaCT	ASO-005626	OxyTs DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs OxyAs DNacs OxyMCs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
11	7,603	7,619	237	253	DES-005627	TtCctttacacCaCaCT	ASO-005627	OxyTs DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
11	7,603	7,619	237	253	DES-005628	TtCctttaccACaCaCT	ASO-005628	OxyTs DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT
11	7,603	7,619	237	253	DES-005629	TtctttaccACaCaCT	ASO-005629	OxyTs DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT

11	7,603	7,619	237	253	DES-005630	TTCctttacaccAcaCT	ASO-005630	OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
11	7,603	7,619	237	253	DES-005631	TtCctttacaccAcaCT	ASO-005631	OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
11	7,603	7,619	237	253	DES-005632	TtcCtttacaccAcaCT	ASO-005632	OxyTs DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
11	7,603	7,619	237	253	DES-005633	TtcctttacaccAcaCT	ASO-005633	OxyTs DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
11	7,603	7,619	237	253	DES-005634	TTCctttacaccAcaCT	ASO-005634	OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAas OxyMCs OxyT
11	7,603	7,619	237	253	DES-005635	TTcctttacaccAcaCT	ASO-005635	OxyTs OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAas OxyMCs OxyT
11	7,603	7,619	237	253	DES-005636	TtCctttacaccAcaCT	ASO-005636	OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAas OxyMCs OxyT
11	7,603	7,619	237	253	DES-005637	TtCctttacaccaCACT	ASO-005637	OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMCs OxyT
11	7,603	7,619	237	253	DES-005638	TTcctttacaccaCaCT	ASO-005638	OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT
11	7,603	7,619	237	253	DES-005639	TtCctttacaccaCaCT	ASO-005639	OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT
11	7,603	7,619	237	253	DES-005640	TTcctttacaccacACT	ASO-005640	OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyAs OxyMCs OxyT
11	7,603	7,619	237	253	DES-005641	TtCctTtacaccacACT	ASO-005641	OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyAs OxyMCs OxyT
11	7,603	7,619	237	253	DES-005642	TtCctttacaccacACT	ASO-005642	OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyAs OxyMCs OxyT
11	7,603	7,619	237	253	DES-005643	TTcctttacaccacaCT	ASO-005643	OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyT
11	7,603	7,619	237	253	DES-005644	TtCctttacaccacaCT	ASO-005644	OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005655	AAttcctttaCacCacaCT	ASO-005655	OxyAs OxyAs DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas OxyMCs DNAas DNacs OxyMCs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005656	AAttCctttaCaccacaCT	ASO-005656	OxyAs OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas OxyMCs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005657	AAttcCtttaCaccacaCT	ASO-005657	OxyAs OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas OxyMCs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005658	AAttCctttacAcCacaCT	ASO-005658	OxyAs OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs OxyAs DNacs OxyMCs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005659	AAttcctttacAcCacaCT	ASO-005659	OxyAs OxyAs DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs OxyAs DNacs OxyMCs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT

9	7,603	7,621	237	255	DES-005660	AAttCctttacAccAcaCT	ASO-005660	OxyAs OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAas DNACs OxyAs DNACs DNACs OxyAs DNACs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005661	AattCctttacAccAcaCT	ASO-005661	OxyAs DNAas DNAts DNAts OxyMCs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAas DNACs OxyAs DNACs DNACs OxyAs DNACs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005662	AAttCctttacAccaCaCT	ASO-005662	OxyAs OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAas DNACs OxyAs DNACs DNACs DNAas OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005663	AAttCctttacAccaACT	ASO-005663	OxyAs OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAas DNACs OxyAs DNACs DNACs DNAas DNACs OxyAs OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005664	AAttCctttacAccacaCT	ASO-005664	OxyAs OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAas DNACs OxyAs DNACs DNACs DNAas DNACs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005665	AAttCctttacaCcAcaCT	ASO-005665	OxyAs OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAas DNACs DNAas OxyMCs DNACs OxyAs DNACs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005666	AAttCctttacaCcAcaCT	ASO-005666	OxyAs OxyAs DNAts DNAts DNACs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAas DNACs DNAas OxyMCs DNACs OxyAs DNACs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005667	AAttCctttacaCcacaCT	ASO-005667	OxyAs OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAas DNACs DNAas OxyMCs DNACs DNAas DNACs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005668	AAttCctttacaCcacaCT	ASO-005668	OxyAs OxyAs DNAts DNAts DNACs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAas DNACs DNAas OxyMCs DNACs DNAas DNACs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005669	AAttCctttacacCaCaCT	ASO-005669	OxyAs OxyAs DNAts DNAts DNACs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAas DNACs DNAas DNACs OxyMCs DNAas OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005670	AAttccTttacacCacACT	ASO-005670	OxyAs OxyAs DNAts DNAts DNACs DNACs OxyTs DNAts DNAts DNAas DNACs DNAas DNACs OxyMCs DNAas DNACs OxyAs OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005671	AattCctttacacCacACT	ASO-005671	OxyAs DNAas DNAts DNAts OxyMCs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAas DNACs DNAas DNACs OxyMCs DNAas DNACs OxyAs OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005672	AattCctttacacCacACT	ASO-005672	OxyAs DNAas DNAts DNAts DNACs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAas DNACs DNAas DNACs OxyMCs DNAas DNACs OxyAs OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005673	AAttCctttacacCacaCT	ASO-005673	OxyAs OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAas DNACs DNAas DNACs OxyMCs DNAas DNACs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005674	AAttCctttacacCacaCT	ASO-005674	OxyAs OxyAs DNAts DNAts DNACs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAas DNACs DNAas DNACs OxyMCs DNAas DNACs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005675	AAttccTttacacCacaCT	ASO-005675	OxyAs OxyAs DNAts DNAts DNACs DNACs OxyTs DNAts DNAts DNAas DNACs DNAas DNACs OxyMCs DNAas DNACs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005676	AAAtCctttacaccACaCT	ASO-005676	OxyAs OxyAs DNAts OxyTs OxyMCs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAas DNACs DNAas DNACs DNACs OxyAs OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005677	AAttCctttacaccACaCT	ASO-005677	OxyAs OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAas DNACs DNAas DNACs DNACs OxyAs OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT



9	7,603	7,621	237	255	DES-005696	AaTcctttacaccAcaCT	ASO-005696	OxyAs DNAas OxyTs DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005697	AatTCctttacaccAcaCT	ASO-005697	OxyAs DNAas DNats OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005698	AatTcctttacaccAcaCT	ASO-005698	OxyAs DNAas DNats OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005699	AattCctttacaccAcaCT	ASO-005699	OxyAs DNAas DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005700	AAttCctttacaccaCACT	ASO-005700	OxyAs OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005701	AAttcctttacaccaCACT	ASO-005701	OxyAs OxyAs DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005702	AATcCctttacaccaCaCT	ASO-005702	OxyAs OxyAs DNats OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005703	AAttCctttacaccaCaCT	ASO-005703	OxyAs OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005704	AAttcCtttacaccaCaCT	ASO-005704	OxyAs OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005705	AAttcctttacaccaCaCT	ASO-005705	OxyAs OxyAs DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005706	AaTtCctttacaccaCaCT	ASO-005706	OxyAs DNAas OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005707	AattCctttacaccaCaCT	ASO-005707	OxyAs DNAas DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005708	AattcctttacaccaCaCT	ASO-005708	OxyAs DNAas DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005709	AATcCctttacaccacACT	ASO-005709	OxyAs OxyAs DNats OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005710	AAttCctTtaccacacACT	ASO-005710	OxyAs OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats OxyTs DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005711	AAttCctttacaccacACT	ASO-005711	OxyAs OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005712	AAttcCtTtaccacacACT	ASO-005712	OxyAs OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs DNats OxyTs DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
9	7,603	7,621	237	255	DES-005713	AAttcCtttaccacacACT	ASO-005713	OxyAs OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT



7	7,603	7,620	237	254	DES-005732	AttCcTttaCaccacaCT	ASO-005732	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs OxyTs DNAts DNAts DNAas OxyMCs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005733	AttCctTtaCaccacaCT	ASO-005733	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts OxyTs DNAts DNAas OxyMCs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005734	AttCctttaCaccacaCT	ASO-005734	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas OxyMCs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005735	AttcCtTtaCaccacaCT	ASO-005735	OxyAs DNAts DNAts DNacs OxyMCs DNAts OxyTs DNAts DNAas OxyMCs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005736	AttcCtttaCaccacaCT	ASO-005736	OxyAs DNAts DNAts DNacs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAas OxyMCs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005737	AttCctttacAccacaCT	ASO-005737	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs OxyAs OxyMCs DNacs OxyAs DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005738	AttCctttacAccacaCT	ASO-005738	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs OxyAs OxyMCs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005739	AttcctttacAcCaCaCT	ASO-005739	OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs OxyAs DNacs OxyMCs OxyAs DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005740	AttCctttacAcCaACT	ASO-005740	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs OxyAs DNacs OxyMCs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005741	AttCctttacAcCaCaCT	ASO-005741	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs OxyAs DNacs OxyMCs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005742	AttCctttacAccacaCT	ASO-005742	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs OxyAs DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005743	AttCctttacAccaCaCT	ASO-005743	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs OxyAs DNacs DNacs DNAas OxyMCs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005744	AttCctttacAccacACT	ASO-005744	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs OxyAs DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005745	ATCctttacAccacaCT	ASO-005745	OxyAs DNAts OxyTs OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs OxyAs DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005746	AttCctttacAccacaCT	ASO-005746	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs OxyAs DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005747	AttCctttacaCcAcACT	ASO-005747	OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-005748	AttcCtttacaCcAcACT	ASO-005748	OxyAs DNAts DNAts DNacs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005796	GaAttcctttaCacCacaCT	ASO-005796	OxyGs DNAas OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas OxyMCs DNAas DNacs OxyMCs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005797	GaAttcctttacAccacaCT	ASO-005797	OxyGs DNAas OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyMCs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005798	GaAttCctttacAccacaCT	ASO-005798	OxyGs DNAas OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAas OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005799	GaAttCctttacAccacACT	ASO-005799	OxyGs DNAas OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs

								OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005800	GaAttCctttacAccacaCT	ASO-005800	OxyGs DNAAs OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs OxyAs DNacs DNacs DNAAs DNacs DNAAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005801	GaAttccctttacAccacaCT	ASO-005801	OxyGs DNAAs OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs OxyAs DNacs DNacs DNAAs DNacs DNAAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005802	GaAttccctttacaCcacaCT	ASO-005802	OxyGs DNAAs OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs OxyMCs DNacs OxyAs DNacs DNAAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005803	GaAttccctttacaCcacaCT	ASO-005803	OxyGs DNAAs OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs OxyMCs DNacs DNAAs DNacs DNAAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005804	GAATCctttacacCaCaCT	ASO-005804	OxyGs OxyAs OxyAs DNAts OxyTs DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs OxyMCs DNAAs OxyMCs DNAAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005805	GaAttccctttacacCaCaCT	ASO-005805	OxyGs DNAAs OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs OxyMCs DNAAs OxyMCs DNAAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005806	GaAttCctttacacCacaCT	ASO-005806	OxyGs DNAAs OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs OxyMCs DNAAs DNacs DNAAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005807	GaAttccTttacacCacaCT	ASO-005807	OxyGs DNAAs OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs OxyTs DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs OxyMCs DNAAs DNacs DNAAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005808	GaAttccctttacacCacaCT	ASO-005808	OxyGs DNAAs OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs OxyMCs DNAAs DNacs DNAAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005809	GaATTcctttacaccAcACT	ASO-005809	OxyGs DNAAs OxyAs OxyTs OxyTs DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs OxyAs OxyMCs DNAAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005810	GaAttCctttacaccAcACT	ASO-005810	OxyGs DNAAs OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005811	GaAttccTttacaccAcACT	ASO-005811	OxyGs DNAAs OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs OxyTs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005812	GaAttCcTttacaccAcaCT	ASO-005812	OxyGs DNAAs OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs OxyTs DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005813	GaAttCctttacaccAcaCT	ASO-005813	OxyGs DNAAs OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005814	GaAttcCtttacaccAcaCT	ASO-005814	OxyGs DNAAs OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005815	GaAttccTttacaccAcaCT	ASO-005815	OxyGs DNAAs OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs OxyTs DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005816	GaAttccctttacaccAcaCT	ASO-005816	OxyGs DNAAs OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs OxyAs DNacs DNAAs OxyMCs OxyT

10	7,603	7,622	237	256	DES-005817	GAATtcctttacaccaCAC T	ASO-005817	OxyGs OxyAs OxyAs OxyTs DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005818	GAAttcctttacaccaCAC T	ASO-005818	OxyGs OxyAs OxyAs DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005819	GAAttcctttacaccaCAC T	ASO-005819	OxyGs OxyAs DNAas DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005820	GAATtcctttacaccacAC T	ASO-005820	OxyGs OxyAs OxyAs OxyTs DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005821	GAATtcctttacaccacACT	ASO-005821	OxyGs OxyAs OxyAs DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005822	GAAttcctttacaccacACT	ASO-005822	OxyGs OxyAs DNAas DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005823	GaAttcCtttacaccacAC T	ASO-005823	OxyGs DNAas OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005824	GaAttccTttacaccacAC T	ASO-005824	OxyGs DNAas OxyAs DNats DNats DNacs DNacs OxyTs DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005825	GaAttcctTtacaccacAC T	ASO-005825	OxyGs DNAas OxyAs DNats DNats DNacs DNacs DNats OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005826	GAATtcctttacaccacaC T	ASO-005826	OxyGs OxyAs OxyAs OxyTs DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005827	GAATtcctttacaccacaCT	ASO-005827	OxyGs OxyAs OxyAs DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005828	GAAttcctttacaccacaCT	ASO-005828	OxyGs OxyAs DNAas DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005829	GaAttCtTtacaccacaC T	ASO-005829	OxyGs DNAas OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs OxyTs DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005830	GaAttCctTtacaccacaC T	ASO-005830	OxyGs DNAas OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005831	GaAttCctttacaccacaCT	ASO-005831	OxyGs DNAas OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005832	GaAttcCtTtacaccacaC T	ASO-005832	OxyGs DNAas OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs DNats OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005833	GaAttcCtttacaccacaCT	ASO-005833	OxyGs DNAas OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005834	GaAttccTTtacaccacaC T	ASO-005834	OxyGs DNAas OxyAs DNats DNats DNacs DNacs OxyTs OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyT

10	7,603	7,622	237	256	DES-005835	GaAttccTttacaccacaC T	ASO-005835	OxyGs DNAAs OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs OxyTs DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNAAs OxyMCs OxyT
10	7,603	7,622	237	256	DES-005836	GaAttcctTtacaccacaC T	ASO-005836	OxyGs DNAAs OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs DNAts OxyTs DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNAAs OxyMCs OxyT
7	7,603	7,620	237	254	DES-316392	attCctttacaccAcAct	ASO-316392	OMeas OMets OMets OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OMeas OMecs OMet
7	7,603	7,620	237	254	DES-316393	attCctttacaccAcAct	ASO-316393	OMeas OMets OMets OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs OxyAs OMecs OxyAs OMecs OMet
7	7,603	7,620	237	254	DES-316394	AttCctttacaccAcAct	ASO-316394	OxyAs OMets OMets OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs OxyAs OMecs OxyAs OMecs OMet
7	7,603	7,620	237	254	DES-316395	AttCctttacaccAcAct	ASO-316395	OxyAs OMets OMets OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OMeas OMecs OMet
12	7,604	7,619	238	253	DES-001263	TTCctttacaccaCAC	ASO-001263	OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs OxyMCs OxyAs OxyMC
12	7,604	7,619	238	253	DES-001421	TTCctttacaccacAC	ASO-001421	OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs DNacs OxyAs OxyMC
12	7,604	7,619	238	253	DES-002816	TTCctttacaccACAC	ASO-002816	OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005367	AAttCctttacaccaCAC	ASO-005367	OxyAs OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005368	AAttcCTttacaccaCAC	ASO-005368	OxyAs OxyAs DNAts DNAts DNacs OxyMCs OxyTs DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005369	AAttcCtTtacaccaCAC	ASO-005369	OxyAs OxyAs DNAts DNAts DNacs OxyMCs DNAts OxyTs DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005370	AAttcCtttacaccaCAC	ASO-005370	OxyAs OxyAs DNAts DNAts DNacs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005371	AAttccTTtacaccaCAC	ASO-005371	OxyAs OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs OxyTs OxyTs DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005372	AAttccTTtacaccaCAC	ASO-005372	OxyAs OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005373	AaTTcctttacaccaCAC	ASO-005373	OxyAs DNAAs OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005374	AaTTcctttacaccaCAC	ASO-005374	OxyAs DNAAs OxyTs OxyTs DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005375	AaTtCctTtacaccaCAC	ASO-005375	OxyAs DNAAs OxyTs DNAts OxyMCs DNacs DNAts OxyTs DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005376	AaTtCctttacaccaCAC	ASO-005376	OxyAs DNAAs OxyTs DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005377	AaTtcCtTtacaccaCAC	ASO-005377	OxyAs DNAAs OxyTs DNAts DNacs OxyMCs DNAts OxyTs DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005378	AaTtcCtttacaccaCAC	ASO-005378	OxyAs DNAAs OxyTs DNAts DNacs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs OxyMCs OxyAs OxyMC

14	7,604	7,621	238	255	DES-005379	AaTtcctttacaccaCAC	ASO-005379	OxyAs DNAas OxyTs DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005380	AatTCcTTtacaccaCAC	ASO-005380	OxyAs DNAas DNats OxyTs OxyMCs DNacs DNats OxyTs DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005381	AatTCctttacaccaCAC	ASO-005381	OxyAs DNAas DNats OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005382	AatTCcTTtacaccaCAC	ASO-005382	OxyAs DNAas DNats OxyTs DNacs OxyMCs DNats OxyTs DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005383	AatTcctttacaccaCAC	ASO-005383	OxyAs DNAas DNats OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005384	AattCctttacaccaCAC	ASO-005384	OxyAs DNAas DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005385	AATTCctttacaccacAC	ASO-005385	OxyAs OxyAs OxyTs DNats OxyMCs OxyMCs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAs DNAs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005386	AAtTCcTTtacaccacAC	ASO-005386	OxyAs OxyAs DNats OxyTs OxyMCs OxyMCs DNats OxyTs DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAs DNAs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005387	AAtTCctttacaccacAC	ASO-005387	OxyAs OxyAs DNats OxyTs OxyMCs OxyMCs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAs DNAs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005388	AAtTCcTTtacaccacAC	ASO-005388	OxyAs OxyAs DNats OxyTs OxyMCs DNacs OxyTs OxyTs DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAs DNAs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005389	AAtTCcTTtacaccacAC	ASO-005389	OxyAs OxyAs DNats OxyTs OxyMCs DNacs OxyTs DNats OxyTs DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAs DNAs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005390	AAfTCctttacaccacAC	ASO-005390	OxyAs OxyAs DNats OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAs DNAs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005391	AAttCCTtacaccacAC	ASO-005391	OxyAs OxyAs DNats DNats OxyMCs OxyMCs OxyTs DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAs DNAs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005392	AAttCCTtacaccacAC	ASO-005392	OxyAs OxyAs DNats DNats OxyMCs OxyMCs DNats OxyTs DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAs DNAs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005393	AAttcCTTtacaccacAC	ASO-005393	OxyAs OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAs DNAs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005394	AaTTCcTTtacaccacAC	ASO-005394	OxyAs DNAas OxyTs OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs OxyTs OxyTs DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAs DNAs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005395	AaTTCctttacaccacAC	ASO-005395	OxyAs DNAas OxyTs OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAs DNAs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005396	AaTTCctttacaccacAC	ASO-005396	OxyAs DNAas OxyTs DNats OxyMCs OxyMCs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAs DNAs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005397	AatTCcTTtacaccacAC	ASO-005397	OxyAs DNAas DNats OxyTs OxyMCs OxyMCs DNats OxyTs DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAs DNAs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005398	AatTCctttacaccacAC	ASO-005398	OxyAs DNAas DNats OxyTs OxyMCs OxyMCs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAs DNAs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005399	AattCCTtacaccacAC	ASO-005399	OxyAs DNAas DNats DNats OxyMCs OxyMCs OxyTs DNats DNats DNAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAs DNAs OxyAs OxyMC

14	7,604	7,621	238	255	DES-005400	AattCCtTtacaccacAC	ASO-005400	OxyAs DNAas DNats DNats OxyMCs OxyMCs DNats OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005401	ATtccTTtaCCacacAC	ASO-005401	OxyAs OxyTs DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas OxyMCs OxyAs OxyMCs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005402	AttcctTTtaCCacacAC	ASO-005402	OxyAs DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas OxyMCs OxyAs DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005403	AttCctTTtaCCacacAC	ASO-005403	OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyMCs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005404	AttCctttacCCacAC	ASO-005404	OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs OxyAs OxyMCs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005405	ATtccTTtaCCaCAC	ASO-005405	OxyAs OxyTs DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs OxyAs OxyMCs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005406	AttCctttacCCaCAC	ASO-005406	OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs OxyAs OxyMCs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005407	ATTcctTTtaCCacacAC	ASO-005407	OxyAs OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs OxyAs OxyMCs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005408	ATtCctTTtaCCacacAC	ASO-005408	OxyAs OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs OxyAs DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005409	ATtCctttacAccACAC	ASO-005409	OxyAs OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs OxyAs DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005410	ATtCctttacAccaCAC	ASO-005410	OxyAs OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs OxyAs DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005411	AtTCctttacAccaCAC	ASO-005411	OxyAs DNats OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs OxyAs DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005412	AttcctttacaCCacAC	ASO-005412	OxyAs DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005413	ATtCctttacaCCacAC	ASO-005413	OxyAs OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyMCs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005414	ATtCctttacaCCacAC	ASO-005414	OxyAs OxyTs DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyMCs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005415	AttCctttacaCCacAC	ASO-005415	OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyMCs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005416	AttcCtttacaCCacAC	ASO-005416	OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyMCs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005417	ATtccTTtaCCacAC	ASO-005417	OxyAs OxyTs DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005418	AttCctttacaCCacAC	ASO-005418	OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005419	AttcCtttacaCCacAC	ASO-005419	OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005420	ATTcctttacaCCacAC	ASO-005420	OxyAs OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC

15	7,604	7,620	238	254	DES-005421	ATTcCtttacaCcAcAC	ASO-005421	OxyAs OxyTs OxyTc DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005422	AttCCtttacaCcAcAC	ASO-005422	OxyAs DNats DNats OxyMCs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005423	ATtcCtttacaCcaCAC	ASO-005423	OxyAs OxyTs DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005424	AttCctttacaCcaCAC	ASO-005424	OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005425	AttcCtttacaCcaCAC	ASO-005425	OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005426	ATTcCtttacaCcacAC	ASO-005426	OxyAs OxyTs OxyTc OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005427	ATTcCtttacaCcacAC	ASO-005427	OxyAs OxyTs OxyTc DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005428	AttCCtttacaCcacAC	ASO-005428	OxyAs DNats DNats OxyMCs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005429	ATTcCtttacaCcacAC	ASO-005429	OxyAs OxyTs OxyTc DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005430	ATTccTttacaCcacAC	ASO-005430	OxyAs OxyTs OxyTc DNacs DNacs OxyTc DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005431	ATtCcTttacaCcacAC	ASO-005431	OxyAs OxyTs DNats OxyMCs DNacs OxyTc DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005432	ATtCcTttacaCcacAC	ASO-005432	OxyAs OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005433	ATtcCtttacaCcacAC	ASO-005433	OxyAs OxyTs DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005434	ATtccTttacaCcacAC	ASO-005434	OxyAs OxyTs DNats DNacs DNacs OxyTc DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005435	AtTCctttacaCcacAC	ASO-005435	OxyAs DNats OxyTc OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005436	AtTcCTttacaCcacAC	ASO-005436	OxyAs DNats OxyTc DNacs OxyMCs OxyTc DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005437	AttcCTttacaCcacAC	ASO-005437	OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs OxyTc DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005438	ATtCcTttacaCaCAC	ASO-005438	OxyAs OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005439	ATtCcTttacaCaCAC	ASO-005439	OxyAs OxyTs DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005440	ATtccTttacaCaCAC	ASO-005440	OxyAs OxyTs DNats DNacs DNacs OxyTc DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005441	ATtcctttacaCaCAC	ASO-005441	OxyAs OxyTs DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC

15	7,604	7,620	238	254	DES-005442	AttCcTttacacCaCAC	ASO-005442	OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs OxyTs DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005443	AttcCTttacacCaCAC	ASO-005443	OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs OxyTs DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005444	ATTcCtttacacCacAC	ASO-005444	OxyAs OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs OxyTs DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005445	ATTcCtttacacCacAC	ASO-005445	OxyAs OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005446	ATTcCtttacacCacAC	ASO-005446	OxyAs OxyTs OxyTs DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005447	ATtCCtttacacCacAC	ASO-005447	OxyAs OxyTs DNats OxyMCs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005448	ATtcCTttacacCacAC	ASO-005448	OxyAs OxyTs DNats DNacs OxyMCs OxyTs DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005449	AttcCTttacacCacAC	ASO-005449	OxyAs DNats DNats OxyMCs OxyMCs OxyTs DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005450	AttCCtttacacCacAC	ASO-005450	OxyAs DNats DNats OxyMCs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005451	ATTcCtttacaccACAC	ASO-005451	OxyAs OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005452	ATTcCtttacaccACAC	ASO-005452	OxyAs OxyTs OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005453	ATtCcTttacaccACAC	ASO-005453	OxyAs OxyTs DNats OxyMCs DNacs OxyTs DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005454	ATtCtttacaccACAC	ASO-005454	OxyAs OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005455	ATtcCtttacaccACAC	ASO-005455	OxyAs OxyTs DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005456	ATtcCtttacaccACAC	ASO-005456	OxyAs OxyTs DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005457	ATCcTttacaccACAC	ASO-005457	OxyAs DNats OxyTs OxyMCs DNacs OxyTs DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005458	AtTCtttacaccACAC	ASO-005458	OxyAs DNats OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005459	AtTcCtttacaccACAC	ASO-005459	OxyAs DNats OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005460	AttCcTttacaccACAC	ASO-005460	OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs OxyTs DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005461	AttCtttacaccACAC	ASO-005461	OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005462	AttcCTttacaccACAC	ASO-005462	OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs OxyTs DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC

14	7,604	7,621	238	255	DES-005463	AAttCctttacaCCacAC	ASO-005463	OxyAs OxyAs DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005464	AattCctttacaCCacAC	ASO-005464	OxyAs DNAas DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005465	AAttCctttacaCCacAC	ASO-005465	OxyAs OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyMCs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005466	AaTtCctttacaCCacAC	ASO-005466	OxyAs DNAas OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyMCs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005467	AaTtCctttacaCCacAC	ASO-005467	OxyAs DNAas OxyTs DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyMCs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005468	AattCctttacaCCacAC	ASO-005468	OxyAs DNAas DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs OxyMCs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005469	AATtCctttacaCCacAC	ASO-005469	OxyAs OxyAs OxyTs DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005470	AAttCctttacaCcACAC	ASO-005470	OxyAs OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005471	AAttCctttacaCcACAC	ASO-005471	OxyAs OxyAs DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005472	AaTtCctttacaCcACAC	ASO-005472	OxyAs DNAas OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005473	AaTtCctttacaCcACAC	ASO-005473	OxyAs DNAas OxyTs DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005474	AattCctttacaCcACAC	ASO-005474	OxyAs DNAas DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005475	AATtCctttacaCcACAC	ASO-005475	OxyAs OxyAs OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005476	AaTtCctttacaCcACAC	ASO-005476	OxyAs DNAas OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005477	AATtCctttacaCcaCAC	ASO-005477	OxyAs OxyAs OxyTs DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005478	AAttCctttacaCcaCAC	ASO-005478	OxyAs OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005479	AaTtCctttacaCcaCAC	ASO-005479	OxyAs DNAas OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005480	AattCctttacaCcaCAC	ASO-005480	OxyAs DNAas DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005481	AaTtCctttacaCcacAC	ASO-005481	OxyAs DNAas OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas OxyMCs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005482	AATtCctttacacCACAC	ASO-005482	OxyAs OxyAs OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005483	AATtCctttacacCACAC	ASO-005483	OxyAs OxyAs OxyTs DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC

14	7,604	7,621	238	255	DES-005484	AAATCctttacacCacAC	ASO-005484	OxyAs OxyAs DNAts OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005485	AAATCctttacacCacAC	ASO-005485	OxyAs OxyAs DNAts OxyTs DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005486	AAAttCctttacacCacAC	ASO-005486	OxyAs OxyAs DNAts DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005487	AAAttCctttacacCacAC	ASO-005487	OxyAs OxyAs DNAts DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005488	AaTTCctttacacCacAC	ASO-005488	OxyAs DNAas OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005489	AaTTCctttacacCacAC	ASO-005489	OxyAs DNAas OxyTs OxyTs DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005490	AaTTcctttacacCacAC	ASO-005490	OxyAs DNAas OxyTs OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005491	AaTtcCctttacacCacAC	ASO-005491	OxyAs DNAas OxyTs DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005492	AaTTCctttacacCacAC	ASO-005492	OxyAs DNAas DNats OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005493	AaTtcCctttacacCacAC	ASO-005493	OxyAs DNAas DNats OxyTs DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005494	AAATCctttacacCaCAC	ASO-005494	OxyAs OxyAs OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005495	AAATcctttacacCaCAC	ASO-005495	OxyAs OxyAs OxyTs DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005496	AAAttCctttacacCaCAC	ASO-005496	OxyAs OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005497	AAAttCctttacacCaCAC	ASO-005497	OxyAs OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005498	AaTTCctttacacCaCAC	ASO-005498	OxyAs DNAas OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005499	AaTtcCctttacacCaCAC	ASO-005499	OxyAs DNAas OxyTs DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005500	AaTTCctttacacCaCAC	ASO-005500	OxyAs DNAas DNats OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005501	AaTtcCctttacacCaCAC	ASO-005501	OxyAs DNAas DNats OxyTs DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005502	AaAttCctttacacCaCAC	ASO-005502	OxyAs DNAas DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005503	AaAttCctttacacCaCAC	ASO-005503	OxyAs DNAas DNats DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005504	AATTCctttacacCacAC	ASO-005504	OxyAs OxyAs OxyTs OxyTs DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs DNAas DNacs OxyAs OxyMC



14	7,604	7,621	238	255	DES-005526	AaTtCtttacaccACAC	ASO-005526	OxyAs DNAas OxyTs DNAts DNacs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005527	AaTtcccttacaccACAC	ASO-005527	OxyAs DNAas OxyTs DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005528	AatTCcTttacaccACAC	ASO-005528	OxyAs DNAas DNAts OxyTs OxyMCs DNacs OxyTs DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005529	AatTCctttacaccACAC	ASO-005529	OxyAs DNAas DNAts OxyTs OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005530	AatTcctttacaccACAC	ASO-005530	OxyAs DNAas DNAts OxyTs DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005531	AattCcTttacaccACAC	ASO-005531	OxyAs DNAas DNAts DNAts OxyMCs DNacs OxyTs DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005532	AattCctttacaccACAC	ASO-005532	OxyAs DNAas DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005533	AattcTttacaccACAC	ASO-005533	OxyAs DNAas DNAts DNAts DNacs OxyMCs OxyTs DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005534	AATtCctttacaccAcAC	ASO-005534	OxyAs OxyAs OxyTs DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005535	AATTCctttacaccAcAC	ASO-005535	OxyAs OxyAs DNAts OxyTs OxyMCs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005536	AATTCctttacaccAcAC	ASO-005536	OxyAs OxyAs DNAts OxyTs OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005537	AAttCCTttacaccAcAC	ASO-005537	OxyAs OxyAs DNAts DNAts OxyMCs OxyMCs OxyTs DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005538	AAttCctttacaccAcAC	ASO-005538	OxyAs OxyAs DNAts DNAts OxyMCs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005539	AaTTCcTttacaccAcAC	ASO-005539	OxyAs DNAas OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs OxyTs DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005540	AaTTCctttacaccAcAC	ASO-005540	OxyAs DNAas OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005541	AaTtCctttacaccAcAC	ASO-005541	OxyAs DNAas OxyTs DNAts OxyMCs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005542	AatTCctttacaccAcAC	ASO-005542	OxyAs DNAas DNAts OxyTs OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005543	AATTcctttacaccaCAC	ASO-005543	OxyAs OxyAs OxyTs OxyTs DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005544	AATtCcTttacaccaCAC	ASO-005544	OxyAs OxyAs OxyTs DNAts OxyMCs DNacs OxyTs DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005545	AATtCctTttacaccaCAC	ASO-005545	OxyAs OxyAs OxyTs DNAts OxyMCs DNacs DNAts OxyTs DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005546	AATtCctttacaccaCAC	ASO-005546	OxyAs OxyAs OxyTs DNAts OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC

14	7,604	7,621	238	255	DES-005547	AATcCtTtacaccaCAC	ASO-005547	OxyAs OxyAs OxyTs DNAts DNacs OxyMCs DNAts OxyTs DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005548	AATcCtttacaccaCAC	ASO-005548	OxyAs OxyAs OxyTs DNAts DNacs OxyMCs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005549	AATccttttacaccaCAC	ASO-005549	OxyAs OxyAs OxyTs DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005550	AAiTcCtTtacaccaCAC	ASO-005550	OxyAs OxyAs DNAts OxyTs OxyMCs DNacs OxyTs DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005551	AAITcCtTtacaccaCAC	ASO-005551	OxyAs OxyAs DNAts OxyTs OxyMCs DNacs DNAts OxyTs DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005552	AAITccttttacaccaCAC	ASO-005552	OxyAs OxyAs DNAts OxyTs OxyMCs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005553	AAITcCtTtacaccaCAC	ASO-005553	OxyAs OxyAs DNAts OxyTs DNacs OxyMCs OxyTs DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005554	AAITcCtTtacaccaCAC	ASO-005554	OxyAs OxyAs DNAts OxyTs DNacs OxyMCs DNAts OxyTs DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005555	AAITccttttacaccaCAC	ASO-005555	OxyAs OxyAs DNAts OxyTs DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005556	AAITcCtTtacaccaCAC	ASO-005556	OxyAs OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs OxyTs OxyTs DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005557	AAITcCtTtacaccaCAC	ASO-005557	OxyAs OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs OxyTs DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005558	AAITcCtTtacaccaCAC	ASO-005558	OxyAs OxyAs DNAts DNAts OxyMCs DNacs DNAts OxyTs DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005645	AattcctttaCACcAcAC	ASO-005645	OxyAs DNAas DNAts DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas OxyMCs OxyAs OxyMCs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005646	AATcctttaCACcAcAC	ASO-005646	OxyAs OxyAs OxyTs DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas OxyMCs OxyAs OxyMCs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005647	AAITcctttaCACcAcAC	ASO-005647	OxyAs OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas OxyMCs OxyAs OxyMCs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005648	AaTtctttaCACcAcAC	ASO-005648	OxyAs DNAas OxyTs DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas OxyMCs OxyAs OxyMCs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005649	AattcctttaCACcAcAC	ASO-005649	OxyAs DNAas DNAts DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas OxyMCs OxyAs DNacs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005650	AAITcctttacACcAcAC	ASO-005650	OxyAs OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs OxyAs OxyMCs OxyMCs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005651	AATcctttacACcAcAC	ASO-005651	OxyAs OxyAs OxyTs DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs OxyAs OxyMCs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005652	AATcctttacACcAcAC	ASO-005652	OxyAs OxyAs DNAts DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs OxyAs OxyMCs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-005653	AaTtctttaCACcAcAC	ASO-005653	OxyAs DNAas OxyTs DNAts DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs OxyAs OxyMCs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC

14	7,604	7,621	238	255	DES-005654	AATcctttacAcCAC	ASO-005654	OxyAs OxyAs OxyTs DNAts DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNacs DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005749	AttcctttacaccACAC	ASO-005749	OxyAs DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNacs DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005750	ATTcCtttacaccAcAC	ASO-005750	OxyAs OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs OxyTs DNats DNats DNAs DNacs DNAs DNacs DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005751	ATTcctttacaccAcAC	ASO-005751	OxyAs OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNacs DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005752	ATTCctttacaccAcAC	ASO-005752	OxyAs OxyTs DNats OxyMCs OxyMCs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAs DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005753	ATtCctttacaccAcAC	ASO-005753	OxyAs OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAs DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005754	AtTCctttacaccAcAC	ASO-005754	OxyAs DNats OxyTs OxyMCs OxyMCs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAs DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005755	AtTCctttacaccAcAC	ASO-005755	OxyAs DNats OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAs DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005756	AttCCTtacaccAcAC	ASO-005756	OxyAs DNats DNats OxyMCs OxyMCs OxyTs DNats DNats DNAs DNacs DNAs DNacs DNacs DNacs OxyAs DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005757	ATTcctttacaccaCAC	ASO-005757	OxyAs OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAs DNacs DNacs DNAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005758	ATTcctttacaccaCAC	ASO-005758	OxyAs OxyTs OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAs DNacs DNacs DNAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005759	ATtCcTttacaccaCAC	ASO-005759	OxyAs OxyTs DNats OxyMCs DNacs OxyTs DNats DNats DNAs DNacs DNAs DNacs DNacs DNAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005760	ATtCctTtacaccaCAC	ASO-005760	OxyAs OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats OxyTs DNats DNAs DNacs DNAs DNacs DNacs DNAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005761	ATtCctttacaccaCAC	ASO-005761	OxyAs OxyTs DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAs DNacs DNacs DNAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005762	ATtCctTtacaccaCAC	ASO-005762	OxyAs OxyTs DNats DNacs OxyMCs DNats OxyTs DNats DNAs DNacs DNAs DNacs DNacs DNAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005763	ATtCctttacaccaCAC	ASO-005763	OxyAs OxyTs DNats DNacs OxyMCs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAs DNacs DNacs DNAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005764	ATtccctttacaccaCAC	ASO-005764	OxyAs OxyTs DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAs DNacs DNacs DNAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005765	AtTCcTttacaccaCAC	ASO-005765	OxyAs DNats OxyTs OxyMCs DNacs OxyTs DNats DNats DNAs DNacs DNAs DNacs DNacs DNAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005766	AtTCctttacaccaCAC	ASO-005766	OxyAs DNats OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAs DNacs DNAs DNacs DNacs DNAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005767	AtTCCTttacaccaCAC	ASO-005767	OxyAs DNats OxyTs DNacs OxyMCs OxyTs DNats DNats DNAs DNacs DNAs DNacs DNacs DNAs OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005768	AtTCCTttacaccaCAC	ASO-005768	OxyAs DNats OxyTs DNacs OxyMCs DNats OxyTs DNats DNAs DNacs DNAs DNacs DNacs DNAs OxyMCs OxyAs OxyMC

15	7,604	7,620	238	254	DES-005769	AtTcctttacaccaCAC	ASO-005769	OxyAs DNAts OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005770	AttCctttacaccaCAC	ASO-005770	OxyAs DNats DNats OxyMCs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005771	AttCctTtacaccaCAC	ASO-005771	OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs OxyTs OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005772	AttCctttacaccaCAC	ASO-005772	OxyAs DNats DNats OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005773	AttCCTTtacaccaCAC	ASO-005773	OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs OxyTs OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005774	AttcCTTtacaccaCAC	ASO-005774	OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs OxyTs DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005775	AttCctTtacaccaCAC	ASO-005775	OxyAs DNats DNats DNacs OxyMCs DNats OxyTs OxyTs DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005776	ATTcCtTtacaccacAC	ASO-005776	OxyAs OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs OxyTs OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005777	ATTcCtTtacaccacAC	ASO-005777	OxyAs OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs OxyTs DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005778	ATTcCtTtacaccacAC	ASO-005778	OxyAs OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNats OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005779	ATTcctttacaccacAC	ASO-005779	OxyAs OxyTs OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005780	ATtCctttacaccacAC	ASO-005780	OxyAs OxyTs DNats OxyMCs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005781	AtTCCTTtacaccacAC	ASO-005781	OxyAs DNats OxyTs OxyMCs OxyMCs OxyTs DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005782	AtTCctttacaccacAC	ASO-005782	OxyAs DNats OxyTs OxyMCs OxyMCs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005783	AtTCctttacaccacAC	ASO-005783	OxyAs DNats OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005784	AttCCTTtacaccacAC	ASO-005784	OxyAs DNats DNats OxyMCs OxyMCs OxyTs OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-005785	AttCCTTtacaccacAC	ASO-005785	OxyAs DNats DNats OxyMCs OxyMCs OxyTs DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
13	7,604	7,622	238	256	DES-008413	GAAttcctttacaccaCAC	ASO-008413	OxyGs OxyAs OxyAs DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs OxyMC
12	7,604	7,619	238	253	DES-287031	tTCctttacaccACac	ASO-287031	OMets OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OMec
12	7,604	7,619	238	253	DES-287957	ttCctttacaccACac	ASO-287957	OMets OMets OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OMecs OxyAs OMec
12	7,604	7,619	238	253	DES-287959	TtctttacaccaCaC	ASO-287959	OxyTs OMets OMecs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OMecs OxyMCs OMecs OxyMC

12	7,604	7,619	238	253	DES-287962	ttCctttacaccACac	ASO-287962	OMets OMets OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OMeas OMec
12	7,604	7,619	238	253	DES-288906	ttcTttacaccacac	ASO-288906	OMets OMets OMecs OMecs OxyTs DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OMeas OMec
12	7,604	7,619	238	253	DES-313413	ttcctttacaccacac	ASO-313413	OMets OMets OMecs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OMeas OMecs OMeas OMec
14	7,604	7,621	238	255	DES-319536	AattCctTtacaccacAc	ASO-319536	OxyAs DNAas DNats DNats OxyMCs OMecs OMets OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OMec
14	7,604	7,621	238	255	DES-319537	aattCctTtacaccacAc	ASO-319537	OMeas DNAas DNats DNats OxyMCs OMecs OMets OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OMec
15	7,604	7,620	238	254	DES-324636	AtTcctttacaccACac	ASO-324636	OxyAs DNats OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OMeas OMec
15	7,604	7,620	238	254	DES-324637	AtTcctttacaccAcAc	ASO-324637	OxyAs DNats OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OMecs OxyAs OMec
15	7,604	7,620	238	254	DES-324638	AtTcctttacaccAcAc	ASO-324638	OxyAs OMets OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OMecs OxyAs OMec
15	7,604	7,620	238	254	DES-324639	atTcctttacaccAcAc	ASO-324639	OMeas OMets OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OMecs OxyAs OMec
15	7,604	7,620	238	254	DES-324640	atTcctttacaccAcac	ASO-324640	OMeas OMets OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OMecs OMeas OMec
15	7,604	7,620	238	254	DES-324641	AtTcctttacaccAcaC	ASO-324641	OxyAs DNats OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OMecs OMeas OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-324642	AtTcctttacaccAcac	ASO-324642	OxyAs OMets OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OMecs OMeas OMec
15	7,604	7,620	238	254	DES-324643	AtTcctttacaccAcaC	ASO-324643	OxyAs OMets OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OMecs OMeas OxyMC
15	7,604	7,620	238	254	DES-324644	AtTcctttacaccCaCac	ASO-324644	OxyAs OMets OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OMeas OxyMCs OMeas OMec
15	7,604	7,620	238	254	DES-324645	AttCctttacaccAcAc	ASO-324645	OxyAs OMets OMets OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OMecs OxyAs OMec
15	7,604	7,620	238	254	DES-324646	AtTcctttacaccCacac	ASO-324646	OxyAs OMets OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs OMecs OMeas OMec
15	7,604	7,620	238	254	DES-324647	AtTcctttacaccCacaC	ASO-324647	OxyAs OMets OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OMeas OMecs OMeas OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-325058	AattcctTtacaccacAc	ASO-325058	OxyAs DNAas DNats DNats OMecs OMecs OMets OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OMec
14	7,604	7,621	238	255	DES-325059	AattCctTtacaccacaC	ASO-325059	OxyAs DNAas DNats DNats OxyMCs OMecs OMets OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OMeas OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-325060	AattcctTtacaccacAC	ASO-325060	OxyAs DNAas DNats DNats OMecs OMecs OMets OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-325061	AattCctTtacaccacAc	ASO-325061	OxyAs OMeas OMets OMets OxyMCs OMecs OMets OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OMec

14	7,604	7,621	238	255	DES-325062	AattcctTtacaccacAc	ASO-325062	OxyAs DNAas DNats DNats OMecs OMecs DNats OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OMec
14	7,604	7,621	238	255	DES-325063	AattcctTtacaccaCaC	ASO-325063	OxyAs DNAas DNats DNats OMecs OMecs OMets OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OMeas OxyMC
14	7,604	7,621	238	255	DES-325064	AattcctTtacaccaCac	ASO-325064	OxyAs DNAas DNats DNats OMecs OMecs OMets OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OMeas OMec
14	7,604	7,621	238	255	DES-325065	AattcctTtacaccacAc	ASO-325065	OxyAs OMeas DNats DNats DNacs OMecs OMets OMets OxyTs DNats DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OMec
14	7,604	7,621	238	255	DES-325066	AattcctTtacaccacAc	ASO-325066	OxyAs OMeas OMets DNats DNacs OMecs OMets OMets OxyTs DNats DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OMec
14	7,604	7,621	238	255	DES-325067	AattcctTtacaccAcAc	ASO-325067	OxyAs DNAas DNats DNats OMecs OMecs OMets OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OMecs OxyAs OMec
14	7,604	7,621	238	255	DES-325068	AattcctTtacaccACac	ASO-325068	OxyAs DNAas DNats DNats OMecs OMecs OMets OxyTs DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OMeas OMec
14	7,604	7,621	238	255	DES-325069	AattcctTtacaccacAc	ASO-325069	OxyAs OMeas OMets DNats DNacs DNacs OMets OMets OMets OxyAs DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OMec
17	7,605	7,620	239	254	DES-001255	ATTcctttacacACA	ASO-001255	OxyAs OxyTs OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs OxyMCs OxyA
17	7,605	7,620	239	254	DES-001412	ATcctttacaccaCA	ASO-001412	OxyAs OxyTs DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs DNAas OxyMCs OxyA
16	7,605	7,622	239	256	DES-008412	GAattcctttacaccACA	ASO-008412	OxyGs OxyAs OxyAs DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyA
18	7,606	7,623	240	257	DES-008414	TGAattcctttacacCAC	ASO-008414	OxyTs OxyGs OxyAs DNAas DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyMCs OxyAs OxyMC
19	7,607	7,624	241	258	DES-008415	ATGAattcctttacacCA	ASO-008415	OxyAs OxyTs OxyGs OxyAs DNAas DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyMCs OxyA
20	7,608	7,625	242	259	DES-008416	AATgaattcctttacACC	ASO-008416	OxyAs OxyAs OxyTs DNags DNAas DNAas DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNacs DNacs OxyMCs OxyAs OxyMCs OxyMC
Seque nce ID No.	Начало NG_011 851.1	Конец NG_011 851.1	Начало NG_00 0345.3	Конец NM_00 0345.3	DES No.	ASO со схемой	ASO No.	ASO с химической структурой
21	7,611	7,627	245	261	DES-008417	CTAatgaattcctTTAC	ASO-008417	OxyMCs OxyTs OxyAs DNAas DNats DNags DNAas DNAas DNats DNats DNacs DNacs DNats DNats DNats OxyTs OxyTs OxyAs OxyMC

Фиг. 2

SEQ ID No.	Начало NG_0118 51.1	Конец NG_0118 51.1	DES No.	ASO со схемой	ASO No.	ASO с химической структурой
7	7,603	7,620	DES-316392	<u>ATTCTttacaccACACT</u> Схема для SEQ ID NO: 7 OMe3-L1-D9-L2-OMe3	ASO-316392	OMeas OMets OMets OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNacs DNacs DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OMeas OMecs Omet
7	7,603	7,620	DES-316393	<u>ATTCTttacaccACACT</u> Схема для SEQ ID NO: 7 OMe3-L1-D9-L1-OMe1-L1-OMe2	ASO-316393	OMeas OMets OMets OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNacs DNacs DNacs DNacs OxyAs OMecs OxyAs OMecs Omet
7	7,603	7,620	DES-316394	<u>ATTCTttacaccACACT</u> Схема для SEQ ID NO: 7 L1-OMe2-L1-D9-L1-OMe1-L1-OMe2	ASO-316394	OxyAs OMets OMets OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNacs DNacs DNacs DNacs OxyAs OMecs OxyAs OMecs Omet
7	7,603	7,620	DES-316395	<u>ATTCTttacaccACACT</u> Схема для SEQ ID NO: 7 L1-OMe2-L1-D9-L2-OMe3	ASO-316395	OxyAs OMets OMets OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNacs DNacs DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OMeas OMecs Omet
12	7,604	7,619	DES-287031	<u>TTCTttacaccACAC</u> Схема для SEQ ID NO: 12 OMe1-L2-D9-L3-OMe1	ASO-287031	OMets OxyTs OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNacs DNacs DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OMec
12	7,604	7,619	DES-287957	<u>TTCTttacaccACAC</u> Схема для SEQ ID NO: 12 OMe2-L1-D9-L1-OMe1-L1-OMe1	ASO-287957	OMets OMets OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNacs DNacs DNacs DNacs OxyAs OMecs OxyAs OMec
12	7,604	7,619	DES-287959	<u>TTCTttacaccACAC</u> Схема для SEQ ID NO: 12 L1-OMe2-D9-OMe1-L1-OMe1-L1	ASO-287959	OxyTs OMets OMecs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNacs DNacs DNacs DNacs OMeas OxyMCs OMeas OxyMC
12	7,604	7,619	DES-287962	<u>TTCTttacaccACAC</u> Схема для SEQ ID NO: 12 OMe2-L1-D9-L2-OMe2	ASO-287962	OMets OMets OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNacs DNacs DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OMeas OMec
12	7,604	7,619	DES-288906	<u>TTCTTttacaccAC</u> Схема для SEQ ID NO: 12 OMe4-L1-D9-OMe2	ASO-288906	OMets OMets OMecs OMecs OxyTs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNacs DNacs DNacs DNacs DNacs OMeas OMec
12	7,604	7,619	DES-313413	<u>TTCTttacaccACAC</u> Схема для SEQ ID NO: 12 OMe3-D9-OMe4	ASO-313413	OMets OMets OMecs DNacs DNats DNats DNats DNats DNAas DNacs DNacs DNacs DNacs DNacs OMeas OMecs OMeas OMec
14	7,604	7,621	DES-319536	<u>AattCCTTtacaccAC</u> Схема для SEQ ID NO: 14 L1-D3-L1-OMe2-L1-D8-L1-OMe1	ASO-319536	OxyAs DNAas DNats DNats OxyMCs OMecs OMets OxyTs DNats DNAas DNacs DNacs DNacs DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OMec
14	7,604	7,621	DES-319537	<u>AattCCTTtacaccAC</u> Схема для SEQ ID NO: 14 OMe1-D3-L1-OMe2-L1-D8-L1-OMe1	ASO-319537	OMeas DNAas DNats DNats OxyMCs OMecs OMets OxyTs DNats DNAas DNacs DNacs DNacs DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OMec
14	7,604	7,621	DES-325058	<u>AattCCTTtacaccAC</u> Схема для SEQ ID NO: 14 L1-D3-OMe3-L1-D8-L1-OMe1	ASO-325058	OxyAs DNAas DNats DNats OMecs OMecs OMets OxyTs DNats DNAas DNacs DNacs DNacs DNacs DNacs DNAas DNacs OxyAs OMec

14	7,604	7,621	DES-325059	AattCCTTtacaccAC Схема для SEQ ID NO: 14 L1-D3-L1-OMe2-L1-D8-OMe1-L1	ASO-325059	OxyAs DNAAs DNAts DNAts OxyMCs OMecs OMets OxyTs DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs DNacs OMeas OxyMC
14	7,604	7,621	DES-325060	AattCCTTtacaccAC Схема для SEQ ID NO: 14 L1-D3-OMe3-L1-D8-L2	ASO-325060	OxyAs DNAAs DNAts DNAts OMecs OMecs OMets OxyTs DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs DNacs OxyAs OxyMC
14	7,604	7,621	DES-325061	AATTCCTTtacaccAC Схема для SEQ ID NO: 14 L1-OMe3-L1-OMe2-L1-D8-L1-OMe1	ASO-325061	OxyAs OMeas OMets OMets OxyMCs OMecs OMets OxyTs DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs DNacs OxyAs OMec
14	7,604	7,621	DES-325062	AattCCTTtacaccAC Схема для SEQ ID NO: 14 L1-D3-OMe2-D1-L1-D8-L1-OMe1	ASO-325062	OxyAs DNAAs DNAts DNAts OMecs OMecs DNAts OxyTs DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs DNacs OxyAs OMec
14	7,604	7,621	DES-325063	AattCCTTtacaccAC Схема для SEQ ID NO: 14 L1-D3-OMe3-L1-D7-L1-OMe1-L1	ASO-325063	OxyAs DNAAs DNAts DNAts OMecs OMecs OMets OxyTs DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs OxyMCs OMeas OxyMC
14	7,604	7,621	DES-325064	AattCCTTtacaccAC Схема для SEQ ID NO: 14 L1-D3-OMe3-L1-D7-L1-OMe2	ASO-325064	OxyAs DNAAs DNAts DNAts OMecs OMecs OMets OxyTs DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs OxyMCs OMeas OMec
14	7,604	7,621	DES-325065	AAttCCTTtacaccAC Схема для SEQ ID NO: 14 L1-OMe1-D3-OMe3-L1-D7-L1-OMe1	ASO-325065	OxyAs OMeas DNAts DNAts DNacs OMecs OMets OMets OxyTs DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs DNacs OxyAs OMec
14	7,604	7,621	DES-325066	AATtCCTTtacaccAC Схема для SEQ ID NO: 14 L1-OMe2-D2-OMe3-L1-D7-L1-OMe1	ASO-325066	OxyAs OMeas OMets DNAts DNacs OMecs OMets OMets OxyTs DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs DNacs OxyAs OMec
14	7,604	7,621	DES-325067	AattCCTTtacaccAC Схема для SEQ ID NO: 14 L1-D3-OMe3-L1-D6-L1-OMe1-L1-OMe1	ASO-325067	OxyAs DNAAs DNAts DNAts OMecs OMecs OMets OxyTs DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs OxyAs OMecs OxyAs OMec
14	7,604	7,621	DES-325068	AattCCTTtacaccAC Схема для SEQ ID NO: 14 L1-D3-OMe3-L1-D6-L2-OMe3	ASO-325068	OxyAs DNAAs DNAts DNAts OMecs OMecs OMets OxyTs DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OMeas OMec
14	7,604	7,621	DES-325069	AATtccTTTaccaccAC Схема для SEQ ID NO: 14 L1-OMe2-D3-OMe3-L1-D6-L1-OMe1	ASO-325069	OxyAs OMeas OMets DNAts DNacs DNacs OMets OMets OMets OxyAs DNacs DNAAs DNacs DNacs DNAAs DNacs OxyAs OMec
15	7,604	7,620	DES-324636	AtTcctttaccaccAC Схема для SEQ ID NO: 15 L1-D1-L1-D10-L2-OMe2	ASO-324636	OxyAs DNAts OxyTs DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OMeas OMec
15	7,604	7,620	DES-324637	AtTcctttaccaccAC Схема для SEQ ID NO: 15 L1-D1-L1-D10-L1-OMe1-L1-OMe1	ASO-324637	OxyAs DNAts OxyTs DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs OxyAs OMecs OxyAs OMec
15	7,604	7,620	DES-324638	ATTcctttaccaccAC Схема для SEQ ID NO: 15 L1-OMe1-L1-D10-L1-OMe1-L1-OMe1	ASO-324638	OxyAs OMets OxyTs DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAAs DNacs DNAAs DNacs DNacs OxyAs OMecs OxyAs OMec

15	7,604	7,620	DES-324639	АТТсctttacaccACAC Схема для SEQ ID NO: 15 OMe2-L1-D10-L1-OMe1-L1- OMe1	ASO-324639	OMeas OMets OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OMecs OxyAs OMec
15	7,604	7,620	DES-324640	АТТсctttacaccACAC Схема для SEQ ID NO: 15 OMe2-L1-D10-L1-OMe3	ASO-324640	OMeas OMets OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OMecs OMeas OMec
15	7,604	7,620	DES-324641	АТТсctttacaccACAC Схема для SEQ ID NO: 15 L1-D1-L1-D10-L1-OMe2-L1	ASO-324641	OxyAs DNats OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OMecs OMeas OxyMC
15	7,604	7,620	DES-324642	АТТсctttacaccACAC Схема для SEQ ID NO: 15 L1-OMe1-L1-D10-L1-OMe3	ASO-324642	OxyAs OMets OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OMecs OMeas OMec
15	7,604	7,620	DES-324643	АТТсctttacaccACAC Схема для SEQ ID NO: 15 L1-OMe1-L1-D10-L1-OMe2-L1	ASO-324643	OxyAs OMets OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OMecs OMeas OxyMC
15	7,604	7,620	DES-324644	АТТсctttacaccACAC Схема для SEQ ID NO: 15 L1-OMe1-L1-D9-L1-OMe1-L1- OMe2	ASO-324644	OxyAs OMets OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OMeas OxyMCs OMeas OMec
15	7,604	7,620	DES-324645	АТТсctttacaccACAC Схема для SEQ ID NO: 15 L1-OMe2-L1-D9-L1-OMe1-L1- OMe1	ASO-324645	OxyAs OMets OMets OxyMCs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OMecs OxyAs OMec
15	7,604	7,620	DES-324646	АТТсctttacaccACAC Схема для SEQ ID NO: 15 L1-OMe1-L1-D9-L2-OMe3	ASO-324646	OxyAs OMets OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OxyAs OMecs OMeas OMec
15	7,604	7,620	DES-324647	АТТсctttacaccACAC Схема для SEQ ID NO: 15 L1-OMe1-L1-D9-L1-OMe3-L1	ASO-324647	OxyAs OMets OxyTs DNacs DNacs DNats DNats DNats DNAas DNacs DNAas DNacs OxyMCs OMeas OMecs OMeas OxyMC

Фиг. 3

ASO_NO	% концентрация $\alpha$ -синуклеина/GAPDH в SK клетках @25 мкМ	% ингибирование $\alpha$ -синуклеина/тубулина в PAC нейронах @40 нМ	% ингибирование $\alpha$ -синуклеина/тубулина в PAC нейронах @5 мкМ
ASO-001255			96.27
ASO-001263			94.38
ASO-001412			91.64
ASO-001421			97.37
ASO-001435			90.75
ASO-001464			92.75
ASO-001490			97.14
ASO-001649			99.02
ASO-002030			93.54
ASO-002031			97.60
ASO-002032			94.93
ASO-002040			97.13
ASO-002041	4.13	82.56	94.36
ASO-002042			85.68
ASO-002050			97.11
ASO-002051			89.93
ASO-002052			93.98
ASO-002060			95.80
ASO-002061			83.94
ASO-002069			96.98
ASO-002070			79.43
ASO-002078			94.90
ASO-002079			80.79
ASO-002087			97.69
ASO-002088			84.11
ASO-002096			97.35
ASO-002097			95.75
ASO-002098			86.51
ASO-002755		48.78	
ASO-002780	2.15	96.97	
ASO-002816	2.66	95.73	
ASO-005367	17.52	76.59	
ASO-005368	10.20	91.00	
ASO-005369	15.71	90.38	
ASO-005370	14.17	72.42	
ASO-005371	27.99	75.29	
ASO-005372	41.24	29.83	
ASO-005373	12.27	73.27	
ASO-005374	19.62	74.00	
ASO-005375	20.75	65.07	
ASO-005376	8.16	73.51	

## 046118

ASO-005377	23.37	66.56	
ASO-005378	15.67	65.45	
ASO-005379	34.80	25.13	
ASO-005380	7.76	85.92	
ASO-005381	4.30	88.49	
ASO-005382	13.12	84.63	
ASO-005383	15.22	65.97	
ASO-005384	10.24	66.42	
ASO-005385	13.05	92.49	
ASO-005386	19.84	83.76	
ASO-005387	10.28	91.48	
ASO-005388	20.26	90.49	
ASO-005389	28.17	81.70	
ASO-005390	9.41	85.83	
ASO-005391	5.19	99.52	
ASO-005392	6.01	99.57	
ASO-005393	17.03	96.08	
ASO-005394	30.75	59.58	
ASO-005395	14.70	81.46	
ASO-005396	6.85	92.89	
ASO-005397	10.05	92.35	
ASO-005398	6.56	97.44	
ASO-005399	5.27	97.52	
ASO-005400	5.07	95.08	
ASO-005401	64.21	56.38	
ASO-005402	63.39	21.96	
ASO-005403	42.13	47.14	
ASO-005404	42.98	29.14	
ASO-005405	44.76	59.53	
ASO-005406	31.80	56.43	
ASO-005407	40.75	60.14	
ASO-005408	66.02	3.89	
ASO-005409	36.08	58.65	
ASO-005410	19.48	80.74	
ASO-005411	17.06	81.58	
ASO-005412	36.68	49.33	
ASO-005413	22.64	74.63	
ASO-005414	46.39	73.75	
ASO-005415	13.06	80.06	
ASO-005416	31.18	64.65	
ASO-005417	21.46	72.97	
ASO-005418	12.08	66.35	

## 046118

ASO-005419	25.12	65.05	
ASO-005420	40.03	43.34	
ASO-005421	55.96	48.69	
ASO-005422	26.95	77.58	
ASO-005423	37.07	56.12	
ASO-005424	11.62	80.17	
ASO-005425	25.48	63.45	
ASO-005426	20.08	88.79	
ASO-005427	27.37	92.82	
ASO-005428	18.00	93.99	
ASO-005429	26.63	65.88	
ASO-005430	33.05	80.49	
ASO-005431	40.18	63.84	
ASO-005432	7.35	88.12	
ASO-005433	12.11	91.26	
ASO-005434	33.73	74.38	
ASO-005435	9.22	84.22	
ASO-005436	37.40	73.35	
ASO-005437	14.63	90.18	
ASO-005438	6.32	85.04	
ASO-005439	11.22	80.77	
ASO-005440	27.81	77.10	
ASO-005441	15.42	72.69	
ASO-005442	15.12	81.85	
ASO-005443	13.96	86.70	
ASO-005444	39.33	66.39	
ASO-005445	13.73	87.60	
ASO-005446	15.44	88.84	
ASO-005447	13.29	95.26	
ASO-005448	21.56	91.47	
ASO-005449	17.37	94.11	
ASO-005450	8.14	85.96	
ASO-005451	9.09	83.84	
ASO-005452	7.01	98.29	
ASO-005453	8.89	91.53	
ASO-005454	3.11	98.02	
ASO-005455	6.45	96.22	
ASO-005456	19.19	81.26	
ASO-005457	12.05	88.17	
ASO-005458	4.49	91.08	
ASO-005459	8.22	84.28	
ASO-005460	4.66	92.48	

## 046118

ASO-005461	3.76	94.95	
ASO-005462	6.04	92.21	
ASO-005463	41.73	55.32	
ASO-005464	40.76	50.43	
ASO-005465	17.21	86.33	
ASO-005466	24.24	76.29	
ASO-005467	37.11	58.36	
ASO-005468	15.25	76.09	
ASO-005469	26.16	73.60	
ASO-005470	19.38	78.82	
ASO-005471	18.41	61.75	
ASO-005472	31.76	44.09	
ASO-005473	21.32	55.00	
ASO-005474	11.69	70.99	
ASO-005475	36.40	64.16	
ASO-005476	47.05	43.68	
ASO-005477	35.61	50.26	
ASO-005478	17.39	86.08	
ASO-005479	26.06	81.92	
ASO-005480	17.24	79.79	
ASO-005481	27.71	81.71	
ASO-005482	21.97	88.04	
ASO-005483	22.44	85.20	
ASO-005484	18.68	86.95	
ASO-005485	26.39	78.71	
ASO-005486	9.23	96.25	
ASO-005487	12.20	85.38	
ASO-005488	32.36	67.32	
ASO-005489	29.16	65.11	
ASO-005490	18.67	81.62	
ASO-005491	20.33	72.46	
ASO-005492	8.62	89.30	
ASO-005493	16.96	85.74	
ASO-005494	10.40	81.16	
ASO-005495	16.61	83.19	
ASO-005496	6.75	83.08	
ASO-005497	10.12	83.69	
ASO-005498	10.46	67.89	
ASO-005499	17.00	75.48	
ASO-005500	8.84	92.75	
ASO-005501	11.64	81.61	
ASO-005502	5.71	79.52	

## 046118

ASO-005503	10.24	85.75	
ASO-005504	22.71	84.93	
ASO-005505	8.60	87.28	
ASO-005506	16.22	82.42	
ASO-005507	13.39	92.55	
ASO-005508	7.56	83.23	
ASO-005509	11.42	88.58	
ASO-005510	8.12	92.37	
ASO-005511	7.71	89.05	
ASO-005512	18.55	82.94	
ASO-005513	16.46	85.23	
ASO-005514	6.99	94.59	
ASO-005515	18.10	91.10	
ASO-005516	10.97	91.27	
ASO-005517	7.71	92.14	
ASO-005518	4.80	93.80	
ASO-005519	8.31	96.29	
ASO-005520	6.31	89.99	
ASO-005521	13.97	72.63	
ASO-005522	9.76	85.28	
ASO-005523	10.80	88.76	
ASO-005524	13.08	90.00	
ASO-005525	5.99	86.16	
ASO-005526	8.42	89.68	
ASO-005527	20.32	71.11	
ASO-005528	8.79	83.91	
ASO-005529	3.64	94.41	
ASO-005530	10.15	88.68	
ASO-005531	5.41	88.57	
ASO-005532	5.87	96.01	
ASO-005533	5.63	95.42	
ASO-005534	12.76	90.92	
ASO-005535	15.05	86.34	
ASO-005536	8.06	90.50	
ASO-005537	8.08	98.60	
ASO-005538	5.95	97.96	
ASO-005539	27.93	78.89	
ASO-005540	12.96	86.36	
ASO-005541	9.25	86.44	
ASO-005542	7.74	94.22	
ASO-005543	16.90	83.78	
ASO-005544	11.72	85.03	

ASO-005545	18.34	79.65	
ASO-005546	9.64	77.52	
ASO-005547	18.34	80.26	
ASO-005548	16.30	76.04	
ASO-005549	41.60	55.94	
ASO-005550	12.08	86.02	
ASO-005551	15.17	82.85	
ASO-005552	5.58	89.33	
ASO-005553	12.25	90.80	
ASO-005554	24.32	78.47	
ASO-005555	15.67	71.34	
ASO-005556	13.06	88.62	
ASO-005557	10.12	92.53	
ASO-005558	11.15	82.24	
ASO-005559	31.15	61.01	
ASO-005560	48.65	39.08	
ASO-005561	22.05	44.35	
ASO-005562	27.70	72.64	
ASO-005563	29.40	77.21	
ASO-005564	45.52	65.95	
ASO-005565	49.46	38.01	
ASO-005566	31.19	32.04	
ASO-005567	32.63	66.89	
ASO-005568	14.97	73.19	
ASO-005569	8.14	63.26	
ASO-005570	12.70	77.29	
ASO-005571	26.22	78.65	
ASO-005572	19.52	72.48	
ASO-005573	17.21	83.21	
ASO-005574	34.79	48.47	
ASO-005575	52.96	53.50	
ASO-005576	7.71	84.01	
ASO-005577	6.47	64.67	
ASO-005578	5.77	56.00	
ASO-005579	8.46	71.63	
ASO-005580	22.35	41.74	
ASO-005581	21.63	78.89	
ASO-005582	4.79	80.15	
ASO-005583	12.36	76.91	
ASO-005584	6.19	90.23	
ASO-005585	8.69	89.56	
ASO-005586	22.41	57.10	

ASO-005587	15.26	84.62	
ASO-005588	49.66	3.17	
ASO-005589	11.56	68.38	
ASO-005590	40.19	77.77	
ASO-005591	18.55	72.08	
ASO-005592	22.32	66.94	
ASO-005593	18.70	51.87	
ASO-005594	29.63	68.96	
ASO-005595	63.56	18.94	
ASO-005596	9.38	85.78	
ASO-005597	5.60	74.43	
ASO-005598	29.73	54.03	
ASO-005599	8.41	64.80	
ASO-005600	7.08	71.57	
ASO-005601	11.18	47.74	
ASO-005602	10.85	26.77	
ASO-005603	18.91	72.08	
ASO-005604	19.16	64.77	
ASO-005605	39.87	59.61	
ASO-005606	5.55	78.07	
ASO-005607	4.70	82.38	
ASO-005608	7.43	51.91	
ASO-005609	6.22	70.54	
ASO-005610	8.04	67.95	
ASO-005611	9.43	81.08	
ASO-005612	8.27	64.64	
ASO-005613	10.66	83.82	
ASO-005614	47.26	51.68	
ASO-005615	16.73	71.59	
ASO-005616	83.87	33.94	
ASO-005617	10.37	45.48	
ASO-005618	10.65	70.21	
ASO-005619	13.35	71.26	
ASO-005620	11.31	85.73	
ASO-005621	15.13	79.80	
ASO-005622	25.06	82.29	
ASO-005623	39.53	39.38	
ASO-005624	28.57	53.47	
ASO-005625	28.91	86.31	
ASO-005626	34.57	74.88	
ASO-005627	5.41	48.03	
ASO-005628	5.53	38.80	

## 046118

ASO-005629	23.54	70.29	
ASO-005630	5.00	73.02	
ASO-005631	6.67	59.62	
ASO-005632	7.54	65.77	
ASO-005633	21.55	66.66	
ASO-005634	11.62	69.81	
ASO-005635	37.58	82.46	
ASO-005636	16.77	69.66	
ASO-005637	2.21	50.43	
ASO-005638	6.16	61.83	
ASO-005639	7.26	65.48	
ASO-005640	3.99	75.14	
ASO-005641	4.49	86.53	
ASO-005642	6.16	66.69	
ASO-005643	13.04	76.38	
ASO-005644	25.82	43.49	
ASO-005645	49.96	45.31	
ASO-005646	63.52	57.26	
ASO-005647	54.30	78.19	
ASO-005648	53.98	56.54	
ASO-005649	55.87	39.04	
ASO-005650	50.66	56.59	
ASO-005651	42.78	67.05	
ASO-005652	36.20	71.48	
ASO-005653	44.44	61.74	
ASO-005654	39.37	71.08	
ASO-005655	51.39	44.52	
ASO-005656	26.08	71.15	
ASO-005657	37.42	60.52	
ASO-005658	35.54	56.37	
ASO-005659	44.06	41.29	
ASO-005660	39.62	50.33	
ASO-005661	35.48	63.11	
ASO-005662	29.02	75.97	
ASO-005663	19.70	80.74	
ASO-005664	25.65	72.56	
ASO-005665	25.22	66.40	
ASO-005666	40.44	56.99	
ASO-005667	26.80	69.22	
ASO-005668	48.27	61.42	
ASO-005669	28.64	35.01	
ASO-005670	29.85	68.91	

## 046118

ASO-005671	12.43	78.77	
ASO-005672	14.05	61.03	
ASO-005673	18.02	68.90	
ASO-005674	28.33	54.33	
ASO-005675	46.00	49.50	
ASO-005676	11.02	76.17	
ASO-005677	7.11	83.63	
ASO-005678	21.73	66.67	
ASO-005679	9.69	80.73	
ASO-005680	21.39	46.52	
ASO-005681	6.36	83.60	
ASO-005682	4.92	86.72	
ASO-005683	7.08	86.98	
ASO-005684	18.54	70.49	
ASO-005685	8.30	77.42	
ASO-005686	24.20	54.35	
ASO-005687	10.20	77.36	
ASO-005688	25.74	37.26	
ASO-005689	14.02	76.61	
ASO-005690	30.03	47.95	
ASO-005691	12.56	75.54	
ASO-005692	15.25	67.24	
ASO-005693	28.03	57.68	
ASO-005694	61.88	17.27	
ASO-005695	21.11	61.00	
ASO-005696	52.16	10.18	
ASO-005697	10.92	77.73	
ASO-005698	37.94	40.77	
ASO-005699	24.66	66.73	
ASO-005700	4.91	75.64	
ASO-005701	21.94	42.48	
ASO-005702	11.87	73.48	
ASO-005703	10.65	74.13	
ASO-005704	14.74	70.60	
ASO-005705	34.73	31.12	
ASO-005706	10.48	68.44	
ASO-005707	16.74	65.66	
ASO-005708	47.42	16.65	
ASO-005709	9.20	78.53	
ASO-005710	8.54	84.21	
ASO-005711	8.47	77.04	
ASO-005712	10.69	83.96	

ASO-005713	14.89	65.35	
ASO-005714	41.78	37.75	
ASO-005715	10.90	78.63	
ASO-005716	41.43	21.63	
ASO-005717	5.64	87.92	
ASO-005718	12.24	64.33	
ASO-005719	15.27	70.11	
ASO-005720	20.57	70.98	
ASO-005721	17.19	64.77	
ASO-005722	94.39	61.00	
ASO-005723	23.13	48.71	
ASO-005724	27.43	72.96	
ASO-005725	70.13	13.89	
ASO-005726	23.66	51.36	
ASO-005727	20.12	69.40	
ASO-005728	39.49	41.79	
ASO-005729	21.72	59.97	
ASO-005730	20.21	48.89	
ASO-005731	51.12	37.02	
ASO-005732	26.64	72.72	
ASO-005733	27.16	80.88	
ASO-005734	27.44	68.45	
ASO-005735	34.00	71.72	
ASO-005736	37.14	48.04	
ASO-005737	31.92	52.36	
ASO-005738	32.60	61.80	
ASO-005739	56.46	32.50	
ASO-005740	33.66	34.94	
ASO-005741	34.74	45.25	
ASO-005742	40.78	49.09	
ASO-005743	19.35	54.46	
ASO-005744	13.96	66.39	
ASO-005745	14.90	81.24	
ASO-005746	23.45	53.69	
ASO-005747	13.94	65.28	
ASO-005748	28.51	42.03	
ASO-005749	21.54	71.11	
ASO-005750	21.61	72.90	
ASO-005751	8.23	76.02	
ASO-005752	7.73	86.50	
ASO-005753	5.79	81.68	
ASO-005754	6.93	93.67	

## 046118

ASO-005755	4.92	96.48	
ASO-005756	6.83	97.29	
ASO-005757	6.81	84.03	
ASO-005758	14.54	77.69	
ASO-005759	6.52	86.25	
ASO-005760	11.44	66.99	
ASO-005761	8.84	76.38	
ASO-005762	21.45	70.47	
ASO-005763	12.47	74.10	
ASO-005764	37.49	48.58	
ASO-005765	8.67	89.78	
ASO-005766	5.10	89.86	
ASO-005767	7.79	85.09	
ASO-005768	22.44	72.49	
ASO-005769	23.25	58.54	
ASO-005770	5.92	93.99	
ASO-005771	10.39	91.62	
ASO-005772	10.42	74.11	
ASO-005773	10.29	94.89	
ASO-005774	8.67	84.25	
ASO-005775	19.04	86.96	
ASO-005776	30.28	55.15	
ASO-005777	19.12	60.23	
ASO-005778	10.57	77.39	
ASO-005779	9.30	73.83	
ASO-005780	6.88	93.58	
ASO-005781	13.29	90.31	
ASO-005782	5.47	93.02	
ASO-005783	6.61	90.10	
ASO-005784	8.05	98.15	
ASO-005785	4.46	99.46	
ASO-005796	35.65	52.21	
ASO-005797	32.17	47.64	
ASO-005798	49.94	48.31	
ASO-005799	29.98	67.91	
ASO-005800	39.95	54.08	
ASO-005801	45.76	31.52	
ASO-005802	40.51	44.56	
ASO-005803	49.27	41.01	
ASO-005804	56.83	14.00	
ASO-005805	27.06	36.65	
ASO-005806	27.98	46.90	

046118

ASO-005807	39.09	47.18	
ASO-005808	38.57	23.05	
ASO-005809	53.61	40.32	
ASO-005810	12.51	83.48	
ASO-005811	19.14	70.83	
ASO-005812	39.20	62.10	
ASO-005813	33.79	45.31	
ASO-005814	29.59	54.93	
ASO-005815	41.93	41.91	
ASO-005816	41.43	27.45	
ASO-005817	39.13	32.85	
ASO-005818	20.11	64.45	
ASO-005819	10.14	60.97	
ASO-005820	50.05	41.48	
ASO-005821	26.69	53.16	
ASO-005822	21.22	48.81	
ASO-005823	14.22	66.30	
ASO-005824	26.25	49.14	
ASO-005825	22.50	58.36	
ASO-005826	71.09	21.17	
ASO-005827	51.00	35.81	
ASO-005828	57.25	24.88	
ASO-005829	39.68	58.56	
ASO-005830	31.70	52.40	
ASO-005831	39.12	29.07	
ASO-005832	32.59	54.19	
ASO-005833	30.08	43.10	
ASO-005834	42.79	48.37	
ASO-005835	43.88	27.04	
ASO-005836	38.62	35.19	
ASO-008412	12.07	50.84	
ASO-008413	25.19	18.45	
ASO-008414	4.40	52.18	
ASO-008415	4.95	71.50	
ASO-008416	9.05	51.86	
ASO-008417	19.29	14.90	
ASO-319536		88.06	
ASO-319537		68.15	
ASO-324636		68.54	
ASO-324637		91.53	
ASO-324638		68.30	
ASO-324639		54.07	
ASO-324640		42.02	
ASO-324641		61.84	
ASO-324642		70.52	
ASO-324643		67.13	
ASO-324644		19.76	
ASO-324645		83.39	
ASO-324646		53.72	
ASO-324647		68.75	
ASO-325058		28.14	
ASO-325059		87.43	
ASO-325060		-20.25	
ASO-325061		71.98	
ASO-325062		39.19	
ASO-325063		2.76	
ASO-325064		43.49	
ASO-325065		41.68	
ASO-325066		35.88	
ASO-325067		51.66	
ASO-325068		24.58	
ASO-325069		24.48	

Фиг. 4

ASO_NO	IC50 (мкМ) для $\alpha$ - синуклеина/тубулина в LE PAC
ASO-001412	0.11
ASO-001435	0.02
ASO-001464	0.02
ASO-002816	0.24
ASO-005376	0.08
ASO-005392	0.01
ASO-005400	0.01
ASO-005430	0.02
ASO-005432	0.27
ASO-005433	0.01
ASO-005435	0.01
ASO-005439	0.01
ASO-005440	0.02
ASO-005441	0.02
ASO-005442	0.02
ASO-005445	0.01
ASO-005446	0.01
ASO-005450	0.004
ASO-005451	0.01
ASO-005452	0.25
ASO-005453	0.01
ASO-005454	0.005
ASO-005455	0.01
ASO-005458	0.21
ASO-005459	0.01
ASO-005460	0.01
ASO-005465	0.01
ASO-005480	0.02
ASO-005483	0.004
ASO-005486	0.01
ASO-005496	0.01
ASO-005500	0.01
ASO-005508	0.31
ASO-005512	0.01
ASO-005514	0.01
ASO-005517	0.30
ASO-005518	0.28
ASO-005525	0.11
ASO-005529	0.06
ASO-005530	0.01
ASO-005531	0.01
ASO-005532	0.27

ASO-005533	0.13
ASO-005558	0.01
ASO-005571	0.03
ASO-005573	0.04
ASO-005576	0.01
ASO-005578	0.02
ASO-005581	0.04
ASO-005582	0.01
ASO-005584	0.01
ASO-005585	0.02
ASO-005597	0.02
ASO-005599	0.31
ASO-005606	0.01
ASO-005608	0.29
ASO-005610	0.10
ASO-005611	0.13
ASO-005612	0.01
ASO-005613	0.02
ASO-005621	0.02
ASO-005625	0.04
ASO-005626	0.05
ASO-005628	0.01
ASO-005631	0.01
ASO-005632	0.15
ASO-005633	0.04
ASO-005635	0.09
ASO-005637	0.43
ASO-005640	0.28
ASO-005641	0.27
ASO-005642	0.05
ASO-005649	0.21
ASO-005650	0.11
ASO-005651	0.02
ASO-005652	0.04
ASO-005671	0.01
ASO-005679	0.14
ASO-005682	0.08
ASO-005685	0.24
ASO-005687	0.01
ASO-005703	0.02
ASO-005709	0.43
ASO-005711	0.22

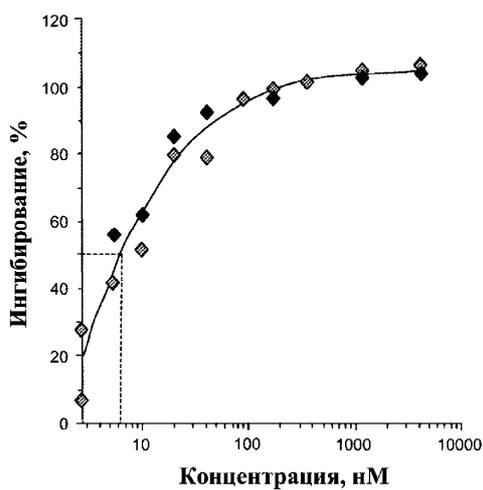
ASO-005717	0.21
ASO-005751	0.25
ASO-005753	0.01
ASO-005755	0.01
ASO-005757	0.08
ASO-005761	0.01
ASO-005762	0.04
ASO-005763	0.02
ASO-005764	0.04
ASO-005766	0.01
ASO-005768	0.02
ASO-005770	0.02
ASO-005783	0.27
ASO-005784	0.25
ASO-005785	0.004
ASO-008414	0.02
ASO-008415	0.02
ASO-287031	0.01
ASO-287957	0.02
ASO-287959	0.03
ASO-287962	0.02
ASO-288906	0.08
ASO-313413	1.11
ASO-316392	0.01
ASO-316393	0.02
ASO-316394	0.01
ASO-316395	0.01
ASO-319536	0.01
ASO-319537	0.02
ASO-324636	0.02
ASO-324637	0.02
ASO-324638	0.02
ASO-324639	0.02
ASO-324641	0.04
ASO-324642	0.02
ASO-324643	0.02
ASO-324644	0.02
ASO-324645	0.01
ASO-324646	0.03
ASO-324647	0.03
ASO-325059	0.01
ASO-325061	0.02
ASO-325067	0.03
ASO-002041	0.04

Фиг. 5

ASO_NO	Tox Score @1D	%KD мPHK в 3D	Tox Score @28D	Tox Score WT @28D	%KD мPHK в 28D Hippo	%KD мPHK в 28D BS	%KD мPHK в 28D Str	%KD белка в 28D Hippo	%KD белка в 28D BS	%KD белка в 28D Str
ASO-001464	8									
ASO-002780	14.67									
ASO-002816	0.15	95.05	20							
ASO-005376	5.20	92.24		0.60						
ASO-005381	2.10	96.36		20.00						
ASO-005390	9.20									
ASO-005392	0.00	92.56		0.00						
ASO-005396	0.20			20.00						
ASO-005399	0.10	77.33		20.00						
ASO-005400	0.10	94.56		2.33						
ASO-005432	0.00			20.00						
ASO-005435	0.60			20.00						
ASO-005450	0.00			20.00						
ASO-005451	0.40	81.58		20.00						
ASO-005452	0.00			20.00						
ASO-005453	0.00	80.42		20.00						
ASO-005454	2.20	95.73		20.00						
ASO-005455	2.30	93.45		4.00						
ASO-005458	0.20			20.00						
ASO-005459	0.50	90.83		0.00						
ASO-005460	0.00	92.84		20.00						
ASO-005486	0.40	95.80		0.20						
ASO-005492	0.20			20.00						
ASO-005496	0.00	85.02		0.00						
ASO-005500	0.20			20.00						
ASO-005502	1.00	97.50		1.20						
ASO-005508	0.00			20.00						
ASO-005514	0.00			20.00						
ASO-005517	0.00			20.00						
ASO-005518	0.40	98.02		2.00						
ASO-005525	0.20	95.31								
ASO-005532	0.00	97.17								
ASO-005576	1.20	72.40		20.00						
ASO-005578	0.10	87.45		0.00						
ASO-005582	0.00	87.64		5.67						
ASO-005584	0.00	83.95		0.00						
ASO-005597	2.10	85.21		0.00						
ASO-005599	0.40			20.00						
ASO-005606	0.00	94.42		3.00						
ASO-005607	0.40			20.00						
ASO-005608	0.60	95.86		1.60						
ASO-005610	1.60	98.41		0.80						
ASO-005611	0.80	94.82		0.00						
ASO-005612	0.60			20.00						
ASO-005628	0.60			2.00						
ASO-005631	1.20			1.00						
ASO-005632	0.60			3.40						

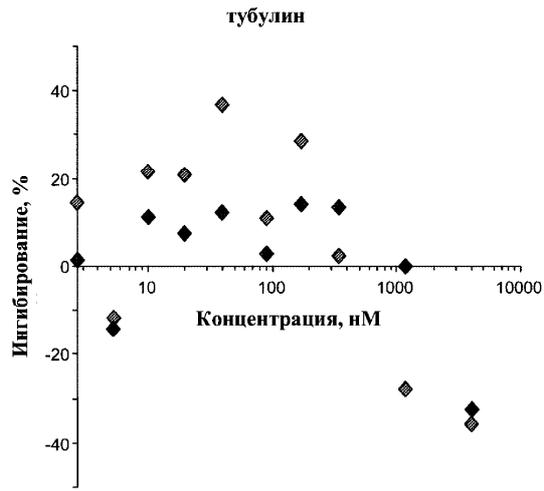
ASO-005637	0.00		5.20						
ASO-005638	0.00		20.00						
ASO-005640	0.40		20.00						
ASO-005641	0.00		4.60						
ASO-005650	0.00		0.00						
ASO-005651	0.00		1.00						
ASO-005652	0.00		0.40						
ASO-005671	0.00		1.40						
ASO-005677	1.20	96.05							
ASO-005679	0.00	95.70							
ASO-005682	8.00	92.07							
ASO-005685	0.00	85.75							
ASO-005700	0.00	92.82	0.00						
ASO-005703	0.40		0.40						
ASO-005709	3.10	96.15	1.00						
ASO-005710	0.20	95.05	0.20						
ASO-005711	0.30	91.78	0.40						
ASO-005717	0.00	96.58	0.00						
ASO-005751	0.40		20.00						
ASO-005753	2.50	91.85	5.17						
ASO-005755	0.60		20.00						
ASO-005757	0.40		20.00						
ASO-005762	0.00		1.00						
ASO-005763	0.60		0.20						
ASO-005764	0.00		1.00						
ASO-005766	0.00	94.10	20.00						
ASO-005770	0.60		20.00						
ASO-005779	0.60		20.00						
ASO-005783	0.00		20.00						
ASO-005784	0.00		20.00						
ASO-005785	0.00		20.00						
ASO-287031	0.00		20.00						
ASO-287957	0.00	68.80	0.00						
ASO-287959	0.00	80.59	0.00						
ASO-287962	0.00	90.88	0.00						
ASO-288906	0.00	67.73	0.00						

Фиг. 6

 **$\alpha$ -синуклеин/тубулин**

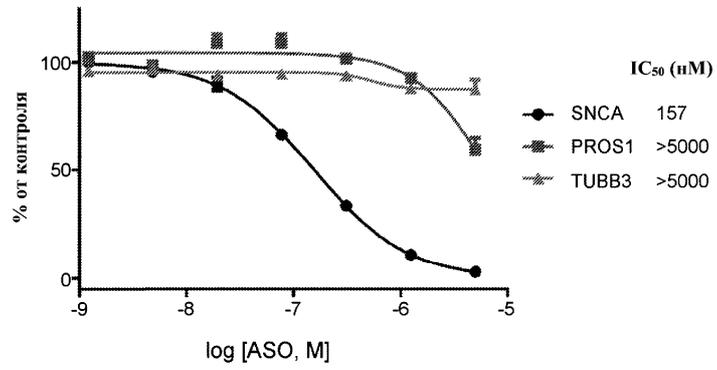
Фиг. 7А

046118



Фиг. 7В

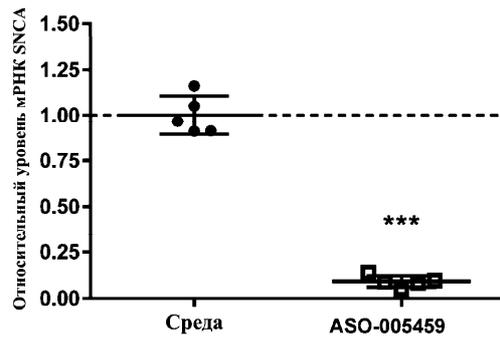
ASO-005459



Фиг. 8

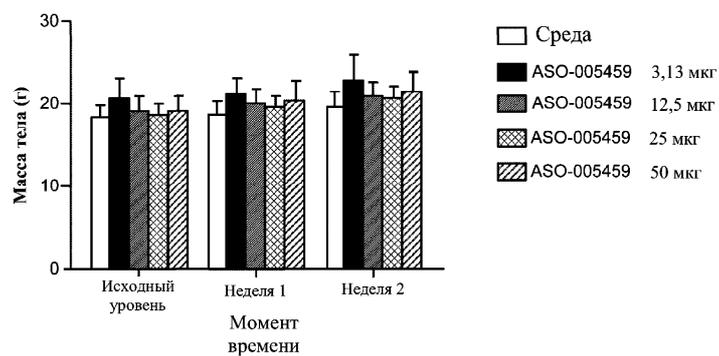
3-суточное исследование  
переносимости

Гиппокамп



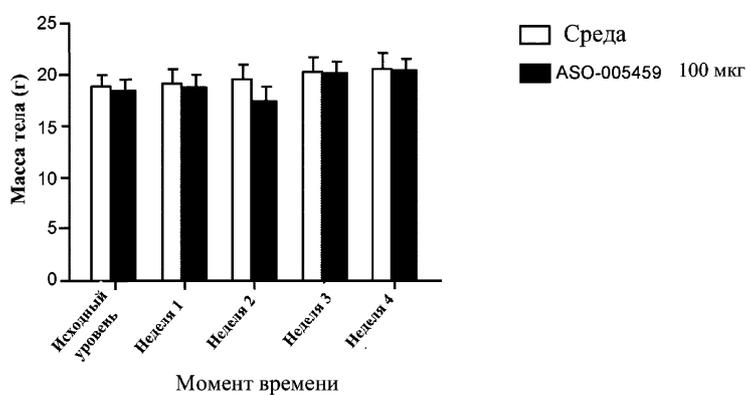
Фиг. 9

14-суточное исследование  
зависимости доза-эффект  
Масса тела



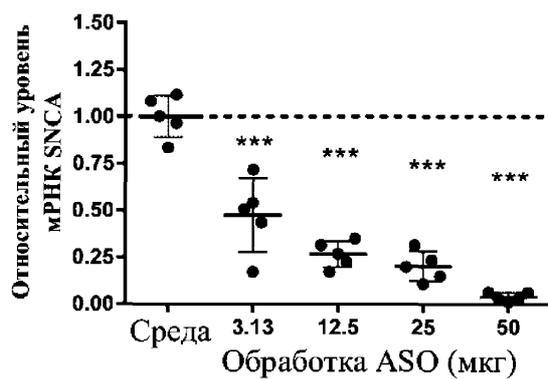
Фиг. 10А

28-суточное исследование  
Масса тела

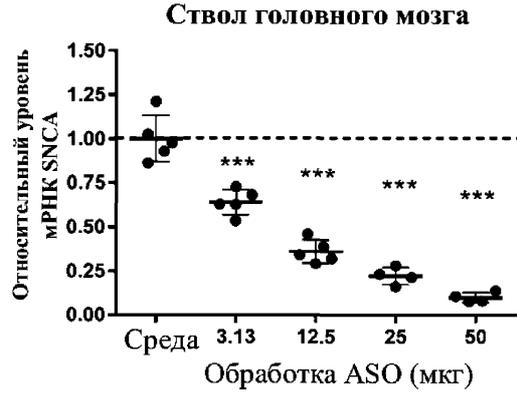


Фиг. 10В

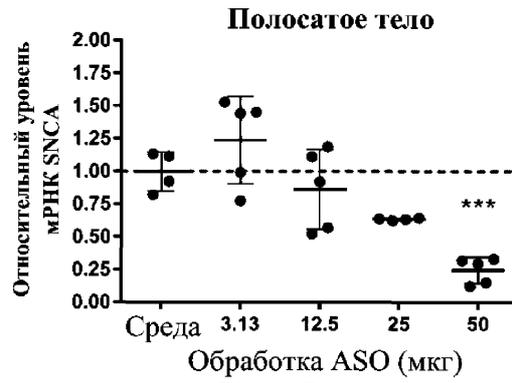
## Гиппокамп



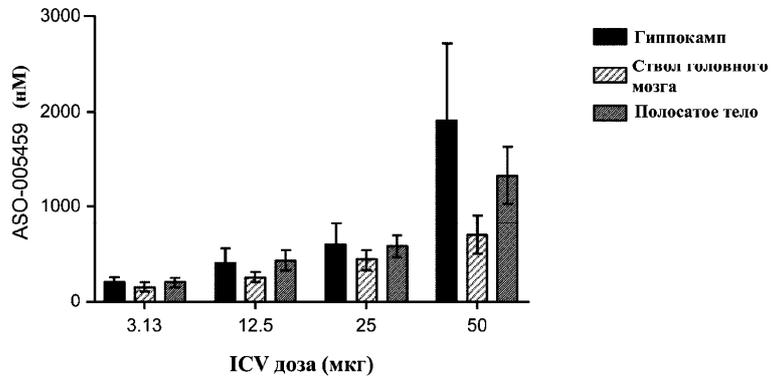
Фиг. 11А



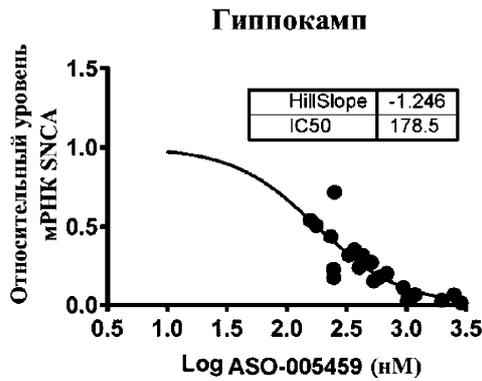
Фиг. 11В



Фиг. 11С

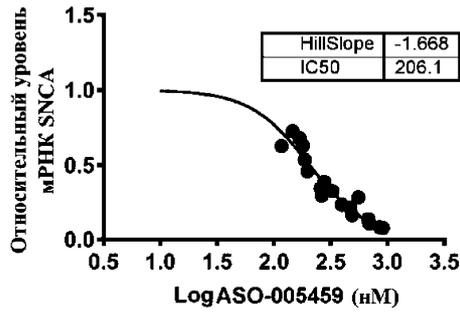


Фиг. 12



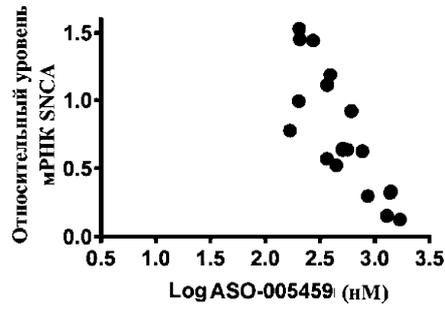
Фиг. 13А

**Ствол головного мозга**



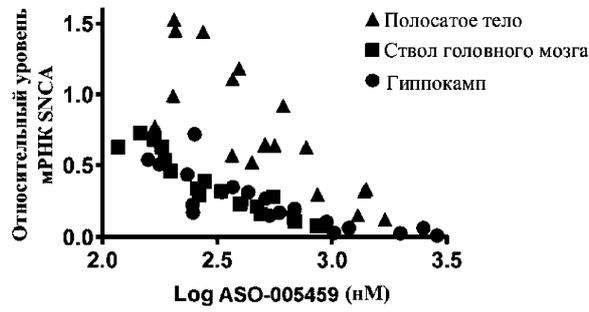
Фиг. 13В

**Полосатое тело**



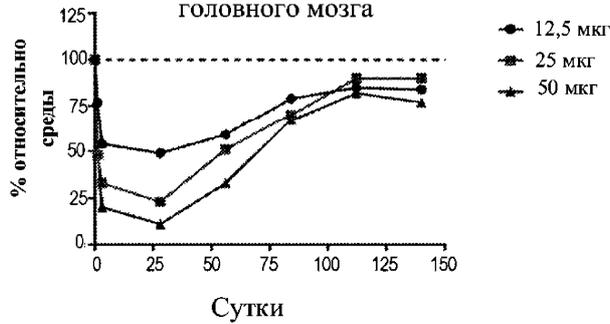
Фиг. 13С

**Объединенные результаты**

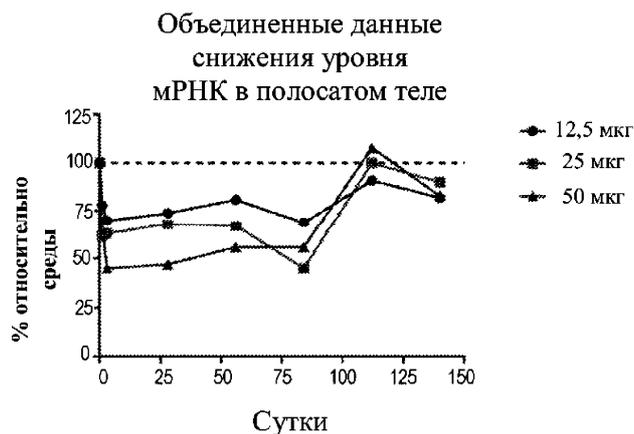


Фиг. 13D

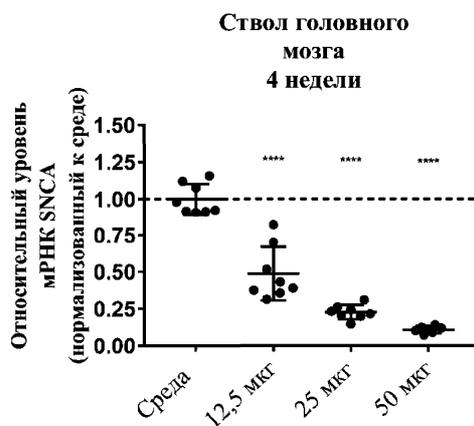
**Объединенные данные снижения уровня мРНК в стволе головного мозга**



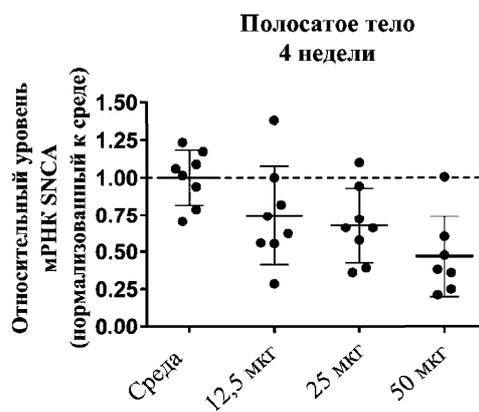
Фиг. 14А



Фиг. 14В

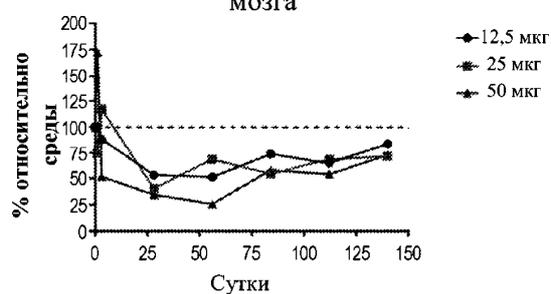


Фиг. 15А



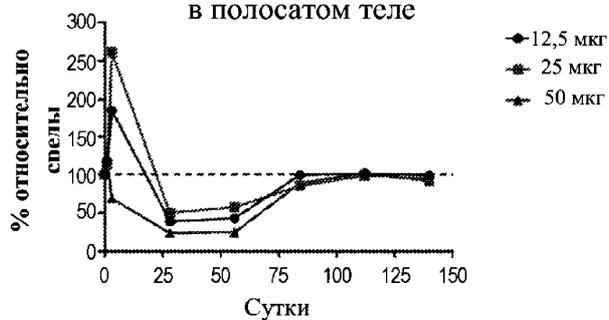
Фиг. 15В

Общие данные  
снижения уровня  
белка  $\alpha$ -синуклеина  
в стволе головного  
мозга



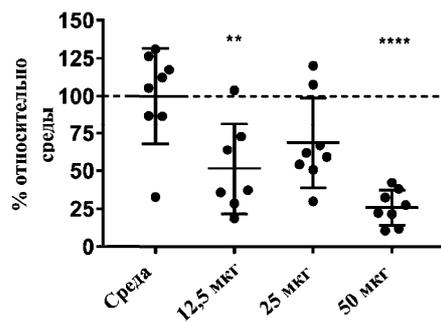
Фиг. 16А

Общие данные  
снижения уровня  
белка  $\alpha$ -синуклеина  
в полосатом теле



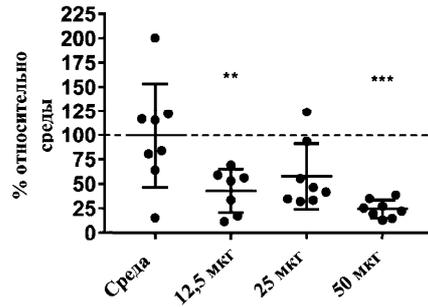
Фиг. 16В

Ствол головного  
мозга  
8 недель

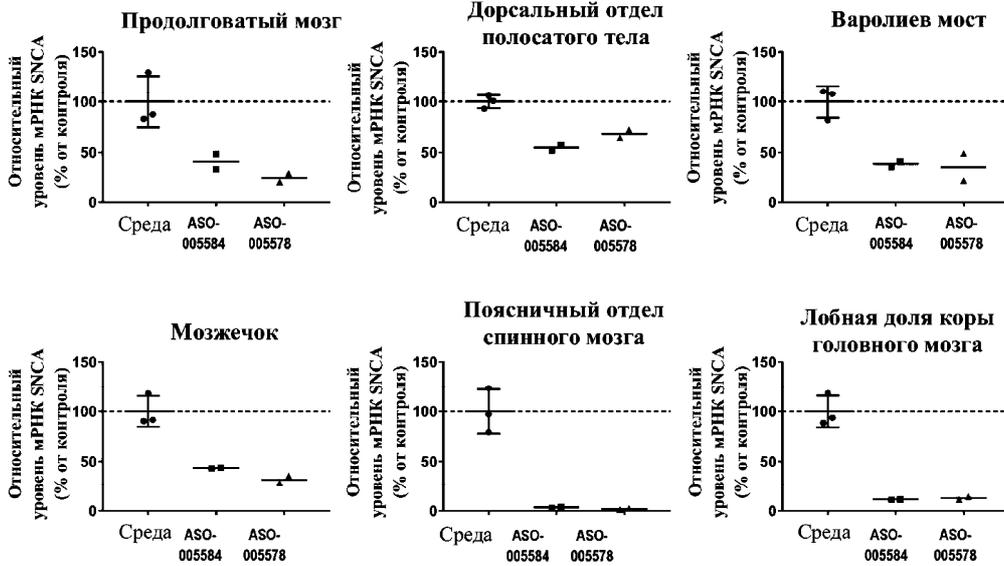


Фиг. 17А

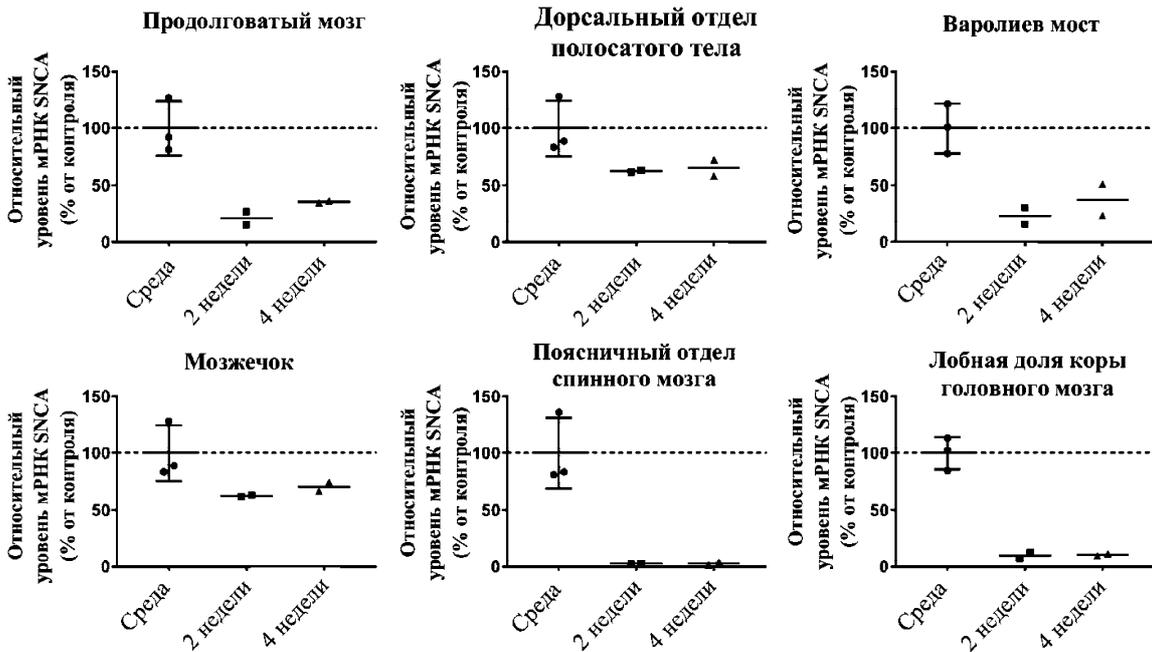
Полосатое тело  
8 недель



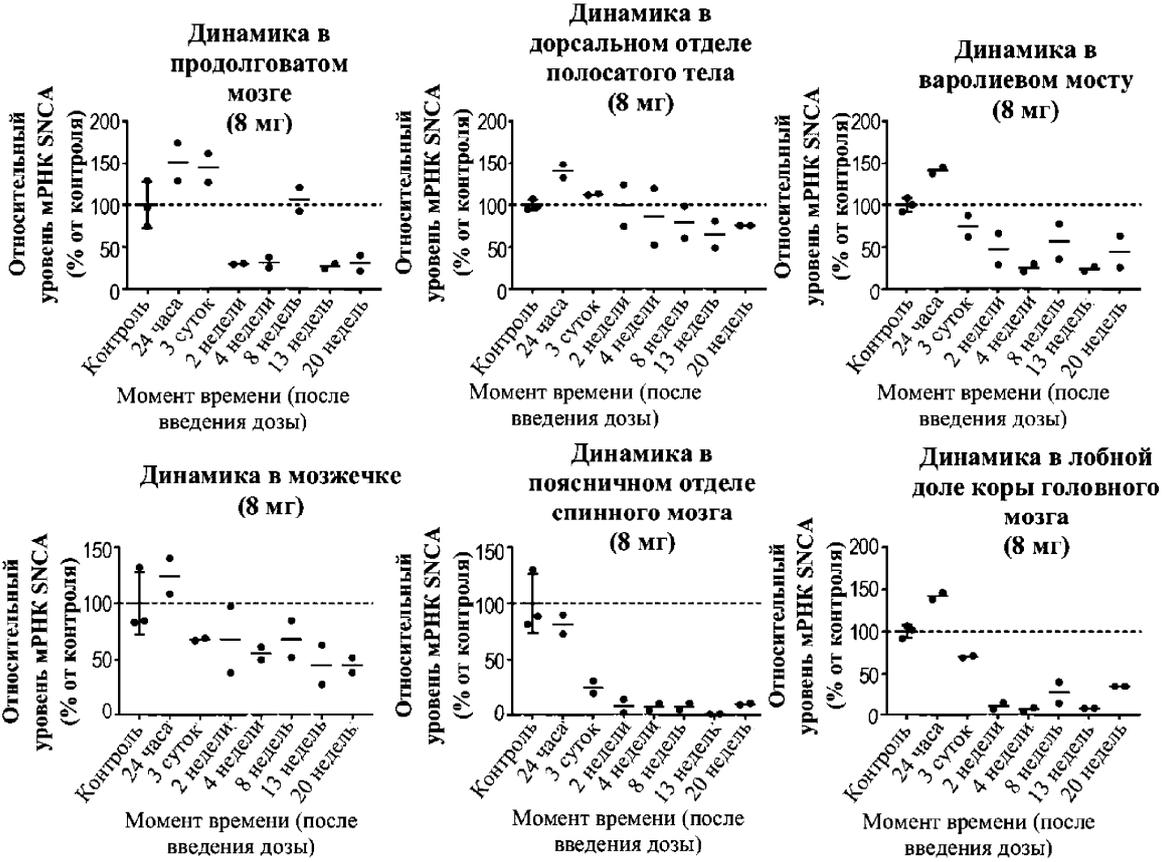
Фиг. 17В



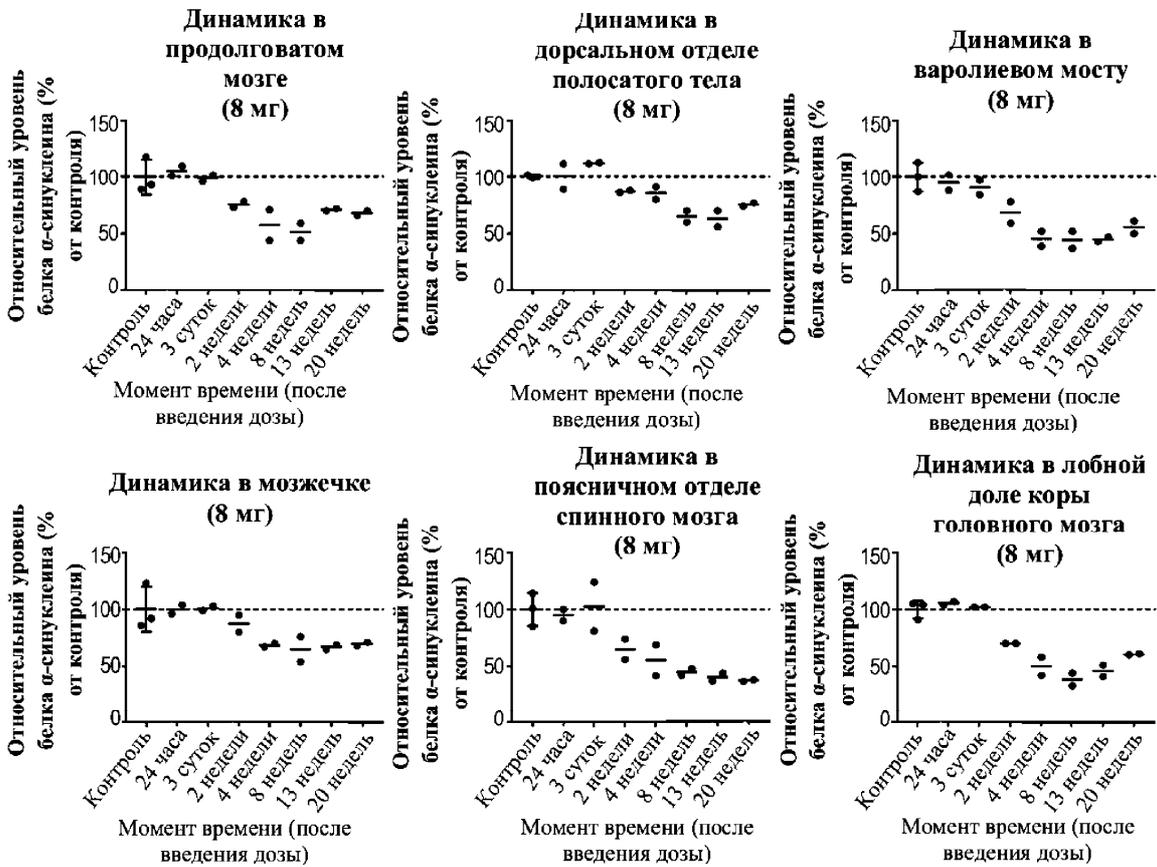
Фиг. 18А



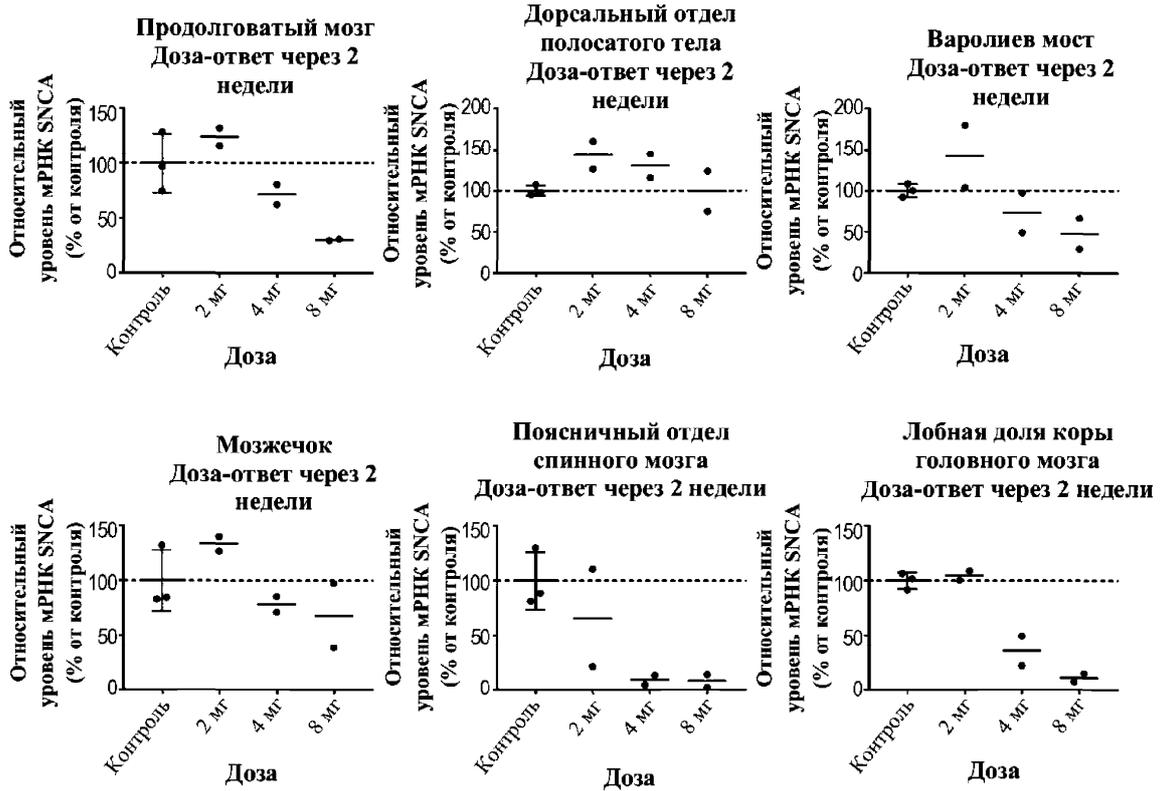
Фиг. 18В



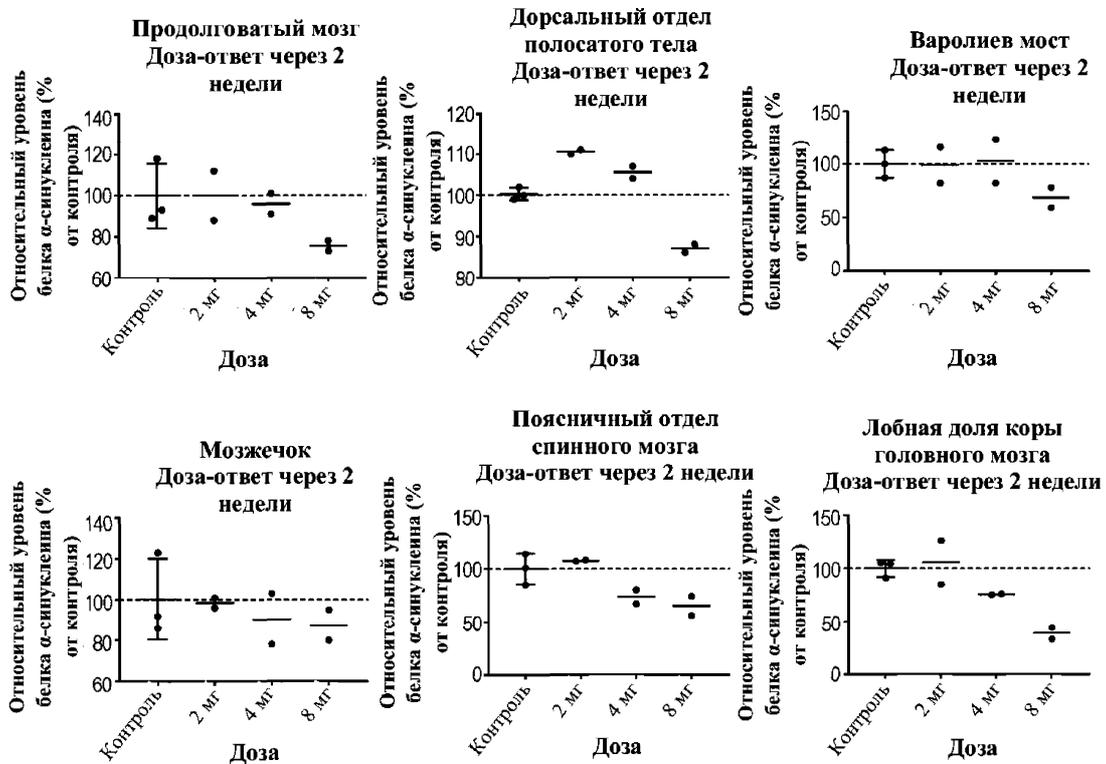
Фиг. 19А



Фиг. 19В



Фиг. 20А

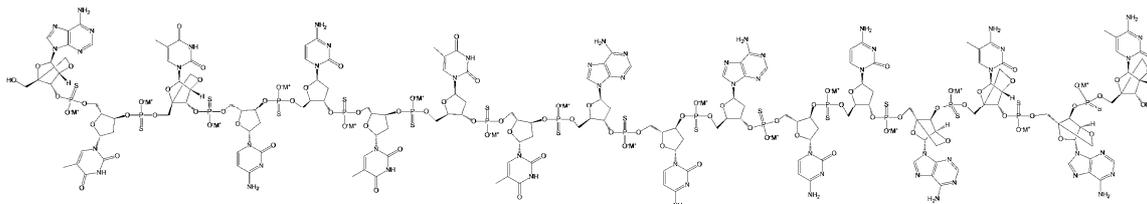


Фиг. 20В

OxyAs DNAts OxyTs DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC

Фиг. 21А

046118



Фиг. 21В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ  
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2