

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202091695** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2021.02.08**

(51) Int. Cl. *A61K 31/712* (2006.01)  
*C12N 15/113* (2010.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2019.01.11**

---

(54) **АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА АЛЬФА-СИНУКЛЕИН, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

(31) **62/616,937**

(32) **2018.01.12**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/013249**

(87) **WO 2019/140231 2019.07.18**

(71) Заявитель:

**БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ  
КОМПАНИ (US); РОШЕ  
ИННОВЕЙШН СЕНТЕР  
КОПЕНГАГЕН А/С (DK)**

(72) Изобретатель:

**Олсон Ричард Е., Какасе Анджела М.,  
Мерedit, м.л., Джери Е., 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 нацелены на мРНК SNCA (например, на место соединения интрона-экзона) в клетке, что приводит к снижению экспрессии белка SNCA. Снижение экспрессии белка SNCA является полезным для лечения некоторых заболеваний, например, неврологического нарушения.

**202091695**  
**A1**

**202091695**

**A1**

## **Антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на альфа-синуклеин, и их применение**

Ссылка на перечень последовательностей, представленный в электронной форме

Содержимое перечня последовательностей th2019e, представленного в электронной форме (имя: 3338\_107PC01\_SequenceListing\_ST25.txt, размер: 10458 байт; и дата создания: 10 января 2019 г.), представленного в настоящей заявке, полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к антисмысловому олигомерному соединению (ASO), которое нацелено на место соединения интрона 1 и экзона 2 транскрипта альфа-синуклеина (SNCA) в клетке, что приводит к снижению экспрессии белка альфа-синуклеина (SNCA). Снижение экспрессии белка SNCA может быть полезным для целого ряда заболеваний, таких как множественная системная атрофия, болезнь Паркинсона, деменция при болезни Паркинсона (PDD) и деменция с тельцами Леви.

Предпосылки создания изобретения

Альфа-синуклеин (SNCA), член семейства белков синуклеинов, представляет собой небольшой растворимый белок, который экспрессируется преимущественно в нервных тканях. См. Marques O *et al.*, *Cell Death Dis.* 19: e350 (2012). Он экспрессируется во многих типах клеток, но преимущественно локализован в пресинаптических окончаниях нейронов. Хотя точная функция еще полностью не выяснена, было выдвинуто предположение о том, что SNCA играет важную роль в регулировании синаптической передачи. Например, SNCA действует в качестве молекулярного шаперона в образовании комплексов SNARE, которые опосредуют докинг синаптических везикул с пресинаптическими мембранами нейронов. SNCA также может взаимодействовать с другими белками, такими как тау-белок, ассоциированный с микротрубочками, который помогает стабилизировать микротрубочки и регулировать везикулярный транспорт.

Из-за роли SNCA в регулировании синаптической передачи, изменения экспрессии и/или функции SNCA могут нарушать важные биологические процессы. Считается, что такие нарушения способствуют  $\alpha$ -синуклеинопатиям, которые представляют собой нейродегенеративные заболевания, характеризующиеся аномальным накоплением белковых агрегатов SNCA в головном мозге.

Соответственно, нерастворимые включения неправильно свернутого, агрегированного и фосфорилированного белка SNCA являются патологическим признаком таких заболеваний, как болезнь Паркинсона (PD), деменция при болезни Паркинсона (PDD), деменция с тельцами Леви (DLB) и множественная системная 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).

$\alpha$ -Синуклеинопатии, такие как болезнь Паркинсона, являются широко распространенными прогрессирующими нейродегенеративными заболеваниями головного мозга, особенно среди пожилых людей. См. Recchia A *et al.*, *FASEB J.* 18: 617-26 (2004). Согласно оценкам, приблизительно 7-10 миллионов человек во всем мире живут с такими нарушениями, при этом только в США регистрируется ежегодно около 60000 новых случаев заболевания. Расходы на лечение для отдельного человека могут легко превысить 2500 долларов в год, а терапевтическая хирургическая операция может стоить до 100000 долларов на пациента. Таким образом, крайне необходимы более надежные и экономически эффективные варианты лечения.

#### Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду (ASO), содержащему, состоящему по существу или состоящему из непрерывной нуклеотидной последовательности AtTcctttacaccACAC (SEQ ID NO: 4), где заглавная буква представляет собой бета-D-окси-LNA, а строчная буква представляет собой ДНК. В других вариантах осуществления ASO содержит межнуклеотидную связь, выбранную из группы, состоящей из фосфодиэфирной связи, фосфотриэфирной связи, метилфосфонатной связи, фосфорамидатной связи, фосфоротиоатной связи и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь.

В некоторых вариантах осуществления ASO содержит, состоит по существу или состоит из OxyAs DNAts OxyTs DNACs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAas DNACs DNAas DNACs DNACs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC, где OxyA, OxyT и Oxy MC представляют собой бета-D-окси-LNA, содержащий аденин, бета-D-окси-LNA, содержащий тимин, и бета-D-окси-LNA, содержащий метилцитозин, соответственно, и где DNAt, DNAC и DNAa представляют собой тимин ДНК, цитозин ДНК и аденин ДНК, соответственно. В некоторых вариантах осуществления ASO по настоящему изобретению имеет молекулярную формулу  $C_{171}H_{214}N_{56}O_{90}P_{16}S_{16}$  и структуру, показанную на фигуре 1B, где  $M^+$  представляет собой противоион. В некоторых

вариантах осуществления противоион выбран из группы, состоящей из  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$ , и любой их комбинации. В определенных вариантах осуществления противоион представляет собой  $Na^+$ .

Настоящее изобретение также обеспечивает конъюгат, содержащий ASO, как раскрыто в настоящем документе, где ASO ковалентно присоединен по меньшей мере к одному нуклеотидному или полинуклеотидному фрагменту. В некоторых вариантах осуществления не-нуклеотидный или не-полинуклеотидный фрагмент содержит белок, цепь жирной кислоты, сахарный остаток, гликопротеин, полимер или любые их комбинации.

Также, в настоящем документе обеспечена фармацевтическая композиция, содержащая ASO или конъюгат, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления композиция, кроме того, содержит терапевтический агент. В определенных вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой антагонист альфа-синуклеина. В некоторых вариантах осуществления антагонист альфа-синуклеина представляет собой антитело против альфа-синуклеина или его фрагмент.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает набор, содержащий ASO, конъюгат или композицию, как раскрыто в настоящем документе. Также, раскрыт диагностический набор, содержащий ASO, конъюгат или композицию по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к способу ингибирования или снижения экспрессии белка SNCA в клетке, при этом способ включает введение ASO, конъюгата или композиции, как раскрыто в настоящем документе, в клетку, экспрессирующую белок SNCA, при этом экспрессия белка SNCA в клетке ингибируется или уменьшается после введения. В некоторых вариантах осуществления ASO ингибирует или снижает экспрессию мРНК *SNCA* в клетке после введения. В некоторых вариантах осуществления экспрессия мРНК *SNCA* снижается по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90% или примерно на 100% после введения по сравнению с клеткой, не подвергшейся воздействию ASO. В других вариантах осуществления ASO снижает экспрессию белка SNCA в клетке после введения по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80% или по

меньшей мере примерно на 90% по сравнению с клеткой, не подвергшейся воздействию ASO. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой нейрон.

В настоящем документе обеспечен способ лечения синуклеинопатии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества ASO, конъюгата или композиции по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления синуклеинопатия выбрана из группы, состоящей из болезни Паркинсона, деменции при болезни Паркинсона (PDD), множественной системной атрофии, деменции с тельцами Леви и любых их комбинаций.

Также, в настоящем документе предлагается применение ASO, конъюгата или композиции по настоящему изобретению для изготовления лекарственного средства. Настоящее изобретение также обеспечивает применение ASO, конъюгата или композиции для изготовления лекарственного средства для лечения синуклеинопатии у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления ASO, конъюгаты или композиция по настоящему изобретению предназначены для применения в терапии синуклеинопатии у субъекта, нуждающегося в этом. В других вариантах осуществления ASO, конъюгаты или композиция по настоящему изобретению предназначены для применения в терапии.

В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления ASO, конъюгаты или композиции вводят перорально, парентерально, интратекально, интрацеребровентрикулярно, пульмонально, местно или интравентрикулярно.

#### Краткое описание фигур

На фигуре 1A показана непрерывная нуклеотидная последовательность ASO-005459. ОхуА, ОхуТ и ОхуМС представляют собой, соответственно, бета-D-окси-LNA, содержащий аденин, бета-D-окси-LNA, содержащий тимин, и бета-D-окси-LNA, содержащий метилцитозин; DNAt, DNAc и DNAa представляют собой, соответственно, тимин ДНК, цитозин ДНК и аденин ДНК; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

На фигуре 1B показана молекулярная структура ASO-005459, как раскрыто в настоящем 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  $NH_4^+$ .

На фигурах 2А и 2В показан эффект ASO-005459 на экспрессию белка SNCA и тубулина (Tub) в первичных нейронах, выделенных из трансгенных мышей A53T-РАС. Нейроны обрабатывали 10-точечным титрованием ASO-005459 и измеряли количество белка SNCA и тубулина. Показано процентное ингибирование соотношения  $\alpha$ -Syn/Tub (фигура 2А) и уровни Tub (фигура 2В). Каждая точка данных представляет отдельный повтор.

На фигуре 3 показан эффект ASO-005459 на уровень экспрессии мРНК SNCA (кружок), белка S (альфа) (PROSI (квадрат)) и тубулина (TUBB3 (треугольник)) в нейронах человека. Нейроны обрабатывали различными концентрациями ASO-005459 в течение 6 дней, а затем измеряли уровни мРНК с помощью анализа QUANTIGENE®. Уровень экспрессии мРНК показан в виде процента от контроля. Показанные данные представляют среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (SD) в результате повторных определений.

На фигуре 4 показаны уровни экспрессии мРНК SNCA в гиппокампе мышей A53T-РАС через три дня после введения ICV 100 мкг ASO-005459 (открытый квадрат) или контрольного носителя (замкнутый круг). Уровни экспрессии мРНК SNCA измеряли с помощью qRT-PCR, нормализовали на уровни мРНК GAPDH и затем выражали относительно среднего уровня экспрессии в группе, получавшей носитель. Горизонтальная линия маркирует эталонное значение, равное 1 (*m.e.* значение, при котором экспрессия мРНК SNCA будет эквивалентна уровню экспрессии, наблюдаемому в контрольной группе, получавшей носитель). Показанные данные представляют собой среднее значение  $\pm$  SD в результате повторного определения. Статистический анализ проведен с помощью одностороннего теста ANOVA с последующим тестом Даннетта. \*\*\*  $p < 0,001$ .

На фигурах 5А и 5В показано сравнение средней массы тела мышей, обработанных ASO-005459. На фигуре 5А мышам A53T-РАС вводили дозу, равную 3,13 мкг, 12,5 мкг, 25 мкг или 50 мкг ASO-005459, и измеряли их массу тела через 0, 1 и 2 недели после обработки. На фигуре 5В мышам C57BL/6 вводили дозу, равную 100 мкг ASO-005459, и массу тела животных измеряли один раз в неделю на протяжении 28-дневного курса. На обеих фигурах 5А и 5В животных, получавших контрольный носитель, использовали в качестве контролей. Показанные данные представляют среднее значение  $\pm$  SD от нескольких животных ( $n = 5$ ). Статистический анализ проведен с помощью двухстороннего теста ANOVA.

На фигурах 6А, 6В и 6С показаны уровни экспрессии мРНК *SNCA* в гиппокампе (фигура 6А), стволе мозга (фигура 6В) и полосатом теле (фигура 6С) мышей А53Т-РАС через 14 дней после введения ICV ASO-005459 (3,13 мкг, 12,5 мкг, 25 мкг или 50 мкг) или контрольного носителя. Уровни мРНК *SNCA* измеряли с помощью qRT-PCR, нормализовали на уровни мРНК GAPDH и затем выражали относительно среднего значения в группе, получавшей носитель. Показанные данные представляют среднее значение  $\pm$  SD от нескольких животных ( $n = 5$ ). Каждый круг представляет отдельное животное. Горизонтальная линия маркирует эталонное значение, равное 1 (*m.e.* значение, при котором экспрессия мРНК *SNCA* будет эквивалентна уровню экспрессии, наблюдаемому в контрольной группе, получавшей носитель). Статистический анализ проведен с помощью одностороннего теста ANOVA с последующим тестом Даннетта. \*\*\*  $p < 0,001$ .

На фигуре 7 показан уровень ASO-005459, детектируемый в гиппокампе (черный), стволе мозга (светло-серый) и полосатом теле (темно-серый) у мышей А53Т-РАС через 14 дней после обработки ASO-005459. Мыши получали 3,13 мкг, 12,5 мкг, 25 мкг или 50 мкг ASO-005459 посредством введения ICV. Показанные данные представляют среднее значение  $\pm$  SD от нескольких животных ( $n = 5$ ).

На фигурах 8А, 8В, 8С и 8D показана взаимосвязь между уровнями воздействия ASO-005459 и экспрессией мРНК *SNCA* в гиппокампе (фигура 8А), стволе мозга (фигура 8В) и полосатом теле (фигура 8С) мышей А53Т-РАС через четырнадцать дней после обработки ASO-005459. На фигуре 8D показаны данные для гиппокампа (круг), ствола мозга (квадрат) и полосатого тела (треугольник) в комбинации. Каждая точка данных представляет отдельное животное. Четырехпараметрическая, нелинейная подгонка показана для гиппокампа (фигура 8А) и ствола мозга (фигура 8В).

На фигурах 9А и 9В показана кривая зависимости доза-ответ, показывающая эффект ASO-005459 на уровень экспрессии мРНК *SNCA* у мышей А53Т-РАС. Животные получали (посредством инъекции ICV) 12,5 мкг (кружок), 25 мкг (квадрат) или 50 мкг (треугольник) ASO-005459 и были умерщвлены через 24 часа, 3 дня, 4, 8, 12, 16 и 20 недель после введения доз. Уровни экспрессии мРНК *SNCA* в стволе головного мозга (фигура 9А) и в полосатом теле (фигура 9В) оценивали с помощью qRT-PCR и затем нормализовали к контрольному носителю. Показаны средние значения. Горизонтальная линия маркирует эталонное значение, равное 100% (*m.e.* значение, при котором экспрессия мРНК *SNCA* будет эквивалентна уровню экспрессии, наблюдаемому в контрольной группе, получавшей носитель).

На фигурах 10А и 10В показан эффект ASO-005459 на уровень экспрессии мРНК *SNCA* у мышей A53T-РАС через 4 недели после введения ASO-005459. Животные получали либо контрольный носитель, либо различные концентрации ASO-005459 (12,5, 25 или 50 мкг). Относительный уровень экспрессии мРНК *SNCA* (нормализованный к контрольному носителю) показан для ствола мозга (фигура 10А) и для полосатого тела (фигура 10В). Каждая точка данных представляет отдельное животное. Также, показано среднее значение  $\pm$  SD от нескольких животных. Статистический анализ проведен с помощью одностороннего теста ANOVA с поправкой Даннетта для множественных сравнений. Горизонтальная линия маркирует эталонное значение, равное 1 (*m.e.* величину, при которой экспрессия мРНК *SNCA* будет эквивалентна уровню экспрессии, наблюдаемому в контрольной группе, получавшей носитель). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

На фигурах 11А и 11В показана кривая зависимости доза-ответ, показывающая эффект ASO-005459 на уровень экспрессии белка *SNCA* в тканях мозга мышей A53T-РАС. Животные получали (посредством инъекции ICV) 12,5 мкг (кружок), 25 мкг (квадрат) или 50 мкг (треугольник) ASO-005459 и были умерщвлены через 24 часа, 3 дня, 4, 8, 12, 16 и 20 недель после дозирования. Уровни белков *SNCA* измеряли как в стволе мозга (фигура 11А), так и в полосатом теле (фигура 11В) с помощью ELISA, а затем нормализовали к контрольному носителю. Показаны средние данные. Горизонтальная линия маркирует эталонное значение, равное 100% (*m.e.* значение, при котором экспрессия мРНК *SNCA* будет эквивалентна уровню экспрессии, наблюдаемому в контрольной группе, получавшей носитель).

На фигурах 12А и 12В показан эффект ASO-005459 на уровень экспрессии белка *SNCA* у мышей A53T-РАС через 8 недель после введения ASO-005459. Животные получали либо контрольный носитель, либо различные концентрации ASO-005459 (12,5, 25 или 50 мкг). Относительные уровни экспрессии белка *SNCA* (нормализованные к контролю носителем) показаны для ствола головного мозга (фигура 12А) и для стриатумы (фигура 12В). Каждая точка данных представляет отдельное животное. Горизонтальная линия маркирует эталонное значение, равное 100% (*m.e.* значение, при котором экспрессия мРНК *SNCA* будет эквивалентна уровню экспрессии, наблюдаемому в контрольной группе, получавшей носитель). Также, показано среднее значение  $\pm$  SD от нескольких животных. Статистический анализ проведен с помощью одностороннего теста ANOVA с поправкой Даннетта для множественных сравнений.



На фигурах 13А и 13В показана кинетика уровней экспрессии мРНК *SNCA* и белка *SNCA* у яванских макаков после введения ASO-005459. Каждое из животных получало либо контрольный носитель, либо ASO-005459 (8 мг) и затем их умерщвляли через 24 часа, 3 дня, 2, 4, 8, 13 или 20 недель после введения дозы. В каждый момент времени уровни экспрессии мРНК *SNCA* (фигура 13А) и белка *SNCA* (фигура 13В) оценивали в следующих тканях: медулла (верхняя левая панель), дорсальный стриатум (верхняя средняя панель), варолиев мост (верхняя правая панель), мозжечок (нижняя левая панель), поясничный отдел спинного мозга позвоночника (нижняя средняя панель) и лобная доля (нижняя правая панель). Уровни экспрессии показаны в процентах от контрольного носителя. Показаны данные как для отдельных животных, так и среднее значение. Горизонтальная линия маркирует эталонное значение, равное 100% (*m.e.* значение, при котором экспрессия мРНК *SNCA* будет эквивалентна уровню экспрессии, наблюдаемому в контрольной группе, получавшей носитель).

На фигурах 14А и 14В показан относительный уровень экспрессии (в процентах от контрольного носителя) как для мРНК *SNCA* (фигура 14А), так и для белка *SNCA* (фигура 14В) у яванских макаков через 2 недели после введения ASO-005459. Животные получали контрольный носитель или различные концентрации ASO-005459 (2, 4 или 8 мг). Уровни экспрессии оценивали в следующих тканях: медулла (верхняя левая панель), дорсальный стриатум (верхняя средняя панель), варолиев мост (верхняя правая панель), мозжечок (нижняя левая панель), поясничный отдел спинного мозга позвоночника (нижняя средняя панель) и лобная доля (нижняя правая панель). Уровни экспрессии показаны в процентах от контрольного носителя. Показаны данные как для отдельных животных, так и среднее значение. Горизонтальная линия маркирует эталонное значение, равное 100% (*m.e.* значение, при котором экспрессия мРНК *SNCA* будет эквивалентна уровню экспрессии, наблюдаемому в контрольной группе, получавшей носитель).

### **Подробное описание изобретения**

#### **I. Определения**

Следует отметить, что термин «а» или «ап» относится к одному или нескольким объектам; например, под «нуклеотидной последовательностью» понимают одну или несколько нуклеотидных последовательностей. Таким образом, термины «а» (или «ап»), «один или несколько» и «по меньшей мере один» могут быть использованы в настоящем документе взаимозаменяемо.

Кроме того, термин «и/или» при использовании в настоящем документе следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, предполагается, что термин «и/или», используемый во фразе, такой как «А и/или В», включает «А и В», «А или В», «А» (по отдельности) и «В» (по отдельности). Аналогично, термин «и/или», используемый во фразе, такой как «А, В и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (по отдельности); В (по отдельности); и С (по отдельности).

Понятно, что везде, где аспекты описаны в настоящем документе с помощью термина «содержащий», возможно их альтернативное аналогичное описание с использованием терминов «состоящий из» и/или «состоящий в основном из».

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

Единицы измерения, префиксы и символы обозначены в их принятой форме Système International de Unites (SI). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, нуклеотидные последовательности пишутся слева направо в 5'-3' ориентации. Аминокислотные последовательности пишутся слева направо в ориентации amino-карбокси. Заголовки, приведенные в настоящем документе, не являются ограничениями различных аспектов раскрытия, которые могут быть сделаны со ссылкой на описание в целом. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, более полно определены посредством ссылки на описание в целом.

Термин «примерно» используется в настоящем документе в значении приблизительно, грубо, около или в области. Если термин «примерно» используется в связи с числовым диапазоном, то он изменяет этот диапазон путем расширения его границ за пределы верхней и нижней границы указанного числового диапазона. Обычно термин «примерно» может изменять числовое значение выше и ниже указанного значения с отклонением, *например*, на 10 процентов вверх или вниз (выше

или ниже). Например, если указано, что «ASO снижает экспрессию белка SNCA в клетке после введения ASO по меньшей мере примерно на 60%», это подразумевает, что уровни SNCA снижаются на величину, находящуюся в диапазоне от 50% до 70%.

Термин «антисмысловой олигонуклеотид» (ASO) относится к олигомеру или полимеру нуклеозидов, таких как встречающиеся в природе нуклеозиды или их модифицированные формы, которые ковалентно связаны друг с другом через межнуклеотидные связи. ASO, полезный для изобретения, включает по меньшей мере один не встречающийся в природе нуклеозид. ASO является комплементарным нуклеиновой кислоте-мишени, таким образом, что ASO гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты-мишени. Термины «антисмысловой ASO», «ASO» и «олигомер», используемые в настоящем документе, являются взаимозаменяемыми с термином «ASO».

Термин «нуклеиновые кислоты» или «нуклеотиды» предназначен для охвата множества нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления термин «нуклеиновые кислоты» или «нуклеотиды» относится 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 быть встречающимися в природе последовательностями внутри клетки. В других вариантах осуществления «нуклеиновые кислоты» или «нуклеотиды» относятся к последовательности в ASO по изобретению. Когда термин относится к последовательности в ASO, нуклеиновые кислоты или нуклеотиды являются не встречающимися в природе, *т.е.* химически синтезированными, ферментативно продуцированными, рекомбинантно продуцированными или полученными с помощью любой их комбинации. В одном варианте осуществления нуклеиновые кислоты или нуклеотиды в ASO продуцированы синтетически или рекомбинантно, но не являются встречающейся в природе последовательностью или ее фрагментом. В другом варианте осуществления нуклеиновые кислоты или нуклеотиды в ASO являются не встречающимися в природе, так как они содержат по меньшей мере один аналог нуклеотида, который не является встречающимся в природе. Термин «нуклеиновая кислота» или «нуклеозид» относится к одному сегменту нуклеиновой кислоты, *например*, ДНК, РНК или их аналогу, присутствующему в полинуклеотиде. «Нуклеиновая кислота» или «нуклеозид» включает встречающиеся в природе нуклеиновые кислоты или не встречающиеся в природе нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления термины

«нуклеотид», «звено» и «мономер» используются взаимозаменяемо. Будет понятно, что в отношении последовательности нуклеотидов или мономеров то, к чему они относятся, является последовательностью оснований, таких как А, Т, G, С или U, и их аналоги.

Используемый в настоящем документе термин «нуклеотид» относится к гликозиду, содержащему сахарную группу, основную группу и ковалентно связанную группу (связывающую группу), такую как фосфатная или фосфоротиоатная межнуклеотидная связывающая группа, и включает как встречающиеся в природе нуклеотиды, такие как ДНК или РНК, так и не встречающиеся в природе нуклеотиды, содержащие модифицированный сахар и/или основание. В настоящем документе один нуклеотид (звено) также может упоминаться как мономер или звено нуклеиновой кислоты.

Используемый в настоящем документе термин «нуклеозид» используется для обозначения гликозида, содержащего сахарную группу и основную группу, которые могут быть ковалентно связаны межнуклеотидными связями между нуклеозидами ASO. В области биотехнологии термин «нуклеозид» обычно используется для обозначения мономера или звена нуклеиновой кислоты. В контексте ASO термин «нуклеозид» может относиться только к взятому в отдельности основанию, *т.е.* к последовательности нуклеотидного основания, содержащей цитозин (ДНК и РНК), гуанин (ДНК и РНК), аденин (ДНК и РНК), тимин (ДНК) и урацил (РНК), где подразумевается наличие сахарного остова и межнуклеотидных связей. Аналогично, в частности, в случае олигонуклеотидов, где одна или несколько межнуклеотидных связывающих групп являются модифицированными, термин «нуклеотид» может относиться к «нуклеозиду». Например, термин «нуклеотид» может быть использован даже при указании на наличие или природу связей между нуклеозидами.

Специалисту в данной области будет понятно, что 5'-концевой нуклеотид олигонуклеотида не содержит 5'-межнуклеотидную связывающую группу, хотя может содержать 5'-концевую группу.

Термин «нижележащая» в отношении нуклеотидной последовательности означает, что нуклеиновая кислота или нуклеотидная последовательность расположена в направлении 3' от эталонной нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления нижележащие нуклеотидные последовательности относятся к последовательностям, которые следуют за точкой старта транскрипции. Например, кодон инициации трансляции гена расположен ниже сайта старта транскрипции.

Если не указано иное, последовательности, представленные в настоящем документе, перечислены от 5'-конца (слева) к 3'-концу (справа).

Термин «вышележащая» относится к нуклеотидной последовательности, которая расположена в направлении 5' от эталонной нуклеотидной последовательности.

Используемый в настоящем документе термин «транскрипт» относится к первичному транскрипту, полученному в результате транскрипции ДНК и после процессинга становится матричной РНК (мРНК), *т.е.* предшественником матричной РНК (пре-мРНК), и самой процессированной мРНК. Термин «транскрипт» может быть использован взаимозаменяемо с «пре-мРНК» и «мРНК». После того как нити ДНК транскрибируются в первичные транскрипты, вновь синтезированные первичные транскрипты модифицируют несколькими способами для преобразования в их зрелые функциональные формы, такие как мРНК, тРНК, рРНК, lncRNA, miRNA и другие. Таким образом, термин «транскрипт» может включать экзоны, интроны, 5' UTR и 3' UTR.

Используемый в настоящем документе термин «экспрессия» относится к процессу, посредством которого полинуклеотид продуцирует генный продукт, например, РНК или полипептид. Он включает, без ограничения, транскрипцию полинуклеотида в матричную РНК (мРНК) и трансляцию мРНК в полипептид. При помощи экспрессии получают «генный продукт». Используемый в настоящем документе генный продукт может представлять собой нуклеиновую кислоту, *например*, матричную РНК, полученную посредством транскрипции гена, или полипептид, который был транслирован с транскрипта. Описанные в настоящем документе генные продукты дополнительно включают нуклеиновые кислоты, прошедшие посттранскрипционные модификации, *например*, полиаденилирование или сплайсинг, или полипептиды, прошедшие посттрансляционные модификации, *например*, метилирование, гликозилирование, добавление липидов, объединение с другими белковыми субъединицами или протеолитическое расщепление.

Термин «встречающийся в природе вариант» полипептида SNCA относится к вариантам последовательности полипептида SNCA или последовательности нуклеиновой кислоты SNCA (*например*, транскрипт), которые существуют в природе в рамках определенной таксономической группы, такой как млекопитающие, такие как мышь, обезьяна и человек. В основном при использовании «встречающихся в природе вариантов» полинуклеотида SNCA термин также может включать любой аллельный

вариант *SNCA*-кодирующей геномной ДНК, которая найдена в положении хромосомы 17q21 посредством хромосомной перестройки или дупликации, и РНК, такой как мРНК, полученной из нее. «Встречающиеся в природе варианты» также могут включать варианты, полученные в результате альтернативного сплайсинга мРНК *SNCA*. В отношении конкретной полипептидной последовательности, *например*, термин также включает встречающиеся в природе формы белка, которые, таким образом, могут подвергаться процессингу, *например*, посредством ко- или посттрансляционных модификаций, таких как отщепление сигнального пептида, протеолитическое расщепление, гликозилирование и т.д.

Используемый в настоящем документе термин «комплемент» обозначает последовательность, которая является комплементарной эталонной последовательности. Хорошо известно, что комплементарность является базовым принципом репликации ДНК и транскрипции, и это свойство присуще двум последовательностям ДНК или РНК, например, когда они совмещены и антипараллельны друг к другу, нуклеотидные основания в каждом положении в последовательностях будут комплементарными, напоминая взгляд в зеркало и наблюдая отражение вещей. Поэтому, например, комплемент последовательности 5' "ATGC" 3' может быть записан как 3' "TACG" 5' или 5' "GCAT" 3'. Термины «обратный комплемент», «обратно комплементарный» и «обратная комплементарность», используемые в настоящем документе, являются взаимозаменяемыми с терминами «комплемент», «комплементарный» и «комплементарность». Таким образом, последовательность 5' attcctttacaccasac 3'(SEQ ID NO: 4) может быть комплементарной 5' gtgtggtgtaaaggaat 3'.

Как используется в настоящем документе, ссылка на номер SEQ ID (*m.e.* SEQ ID NO: 4) включает конкретную нуклеотидную последовательность, но не включает какую-либо конструкцию или полную химическую структуру. Когда в данном описании делается ссылка на конкретный номер ASO (*m.e.* ASO-005459), ссылка включает последовательность, конкретную конструкцию ASO и химическую структуру.

«Активность» обычно выражается в виде значения IC<sub>50</sub> или EC<sub>50</sub> в мкМ, нМ или пМ, если не указано иное. Активность также может быть выражена в процентах ингибирования. IC<sub>50</sub> представляет собой это среднюю ингибирующую концентрацию терапевтической молекулы. EC<sub>50</sub> представляет собой среднюю эффективную концентрацию терапевтической молекулы относительно носителя или контроля

(например, солевого раствора). В функциональных анализах  $IC_{50}$  представляет собой концентрацию терапевтической молекулы, которая снижает биологический ответ, например, транскрипцию мРНК или экспрессию белка, на 50% от биологического ответа, который достигается терапевтической молекулой. В функциональных анализах  $EC_{50}$  представляет собой концентрацию терапевтической молекулы, которая вызывает 50% биологического ответа, например, транскрипцию мРНК или экспрессию белка.  $IC_{50}$  или  $EC_{50}$  могут быть рассчитаны любым количеством способов, известных в данной области.

Под «субъектом» или «индивидуумом», или «животным», или «пациентом», или «млекопитающим» подразумевается любой субъект, в частности, субъект-млекопитающее, для которого желательна диагностика, прогноз или терапия. Субъекты-млекопитающие включают людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных, спортивных животных и животных зоопарка, включая, например, людей, приматов, отличных от человека, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупный рогатый скот, медведей и т.д.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в такой форме, которая позволяет быть эффективной биологической активности активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, являющихся неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет введена композиция. Такая композиция может быть стерильной.

Раскрытое в настоящем документе «эффективное количество» ASO представляет собой количество, достаточное для осуществления конкретно заявленной цели. «Эффективное количество» может быть определено эмпирически и обычным способом в зависимости от заявленной цели.

Термины, такие как «лечебный» или «лечение», или «лечить», или «облегчение», или «облегчать» обозначают как (1) терапевтические меры, которые излечивают, замедляют, уменьшают симптомы и/или останавливают прогрессирование диагностированного патологического состояния или нарушения, так и (2) профилактические или превентивные меры, которые предупреждают и/или замедляют развитие целевого патологического состояния или нарушения. Таким образом, те, кто нуждается в лечении, включают тех, кто уже имеет нарушение; тех, кто предрасположен к появлению нарушения; и тех, у кого нарушение предотвращается. В некоторых вариантах осуществления субъект получает успешное «лечение» заболевания или состояния, раскрытого в другом месте в настоящем документе, в

соответствии со способами, представленными в настоящем документе, если пациент демонстрирует, *например*, полное, частичное или временное ослабление или устранение симптомов, связанных с заболеванием или нарушением.

## II. ASO-005459

ASO по настоящему изобретению (*т.е.* ASO-005459) содержит непрерывную нуклеотидную последовательность длиной 17 нуклеотидов, которая соответствует комплементу области (*т.е.* соединению между интроном 1 и экзоном 2) транскрипта *SNCA*, *т.е.* нуклеотидов 7604-7620 из SEQ ID NO: 1. ASO по изобретению имеет нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4 (*т.е.* attcctttacaccasac) с дизайном ASO LDLDDDDDDDDDDLLLL (*т.е.*, AtTcctttacaccACAC), где L обозначает нуклеозид закрытой нуклеиновой кислоты (*т.е.* LNA, например, бета-D-окси-LNA), и D обозначает дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК). Соответственно, 1-й, 3-й и 14-17-й нуклеотиды с 5' конца ASO-005459 представляют собой бета-D-окси-LNA, и каждый из других нуклеотидов представляет собой ДНК. Раскрытый в настоящем документе ASO также имеет следующую химическую структуру: OxyAs DNAts OxyTs DNACs DNACs DNAts DNAts DNAts DNAas DNACs DNAas DNACs DNACs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC, где «s» обозначает фосфоротиоатную связь. Структурная формула для ASO-005459 представлена на фигуре 1B, где M<sup>+</sup> представляет собой фармацевтически приемлемый противоион. Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый противоион» относится к иону, который сопровождает ионные формы для поддержания электрической нейтральности, которая не является биологически или иным образом нежелательной, и, таким образом, позволяет получать фармацевтически приемлемую солевую форму. Таким образом, в некоторых вариантах 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 с зарядом 1<sup>+</sup>. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый противоион представляет собой H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> и их комбинации.

Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемые соли» относится к производным ASO-005459, где ASO-005459 модифицирован (*например*, добавление катиона, раскрытого в настоящем документе) путем получения его солей. Такие соли сохраняют желаемую биологическую активность ASO, не оказывая нежелательных токсикологических эффектов. ASO по изобретению может быть представлен в любой солевой форме. В некоторых вариантах осуществления ASO



по изобретению находится в форме натриевой соли. В других вариантах осуществления ASO находится в форме калиевой соли.

ASO-005459 может связываться с местом соединения интрон1/экзон2 мРНК *SNCA* и предотвращать трансляцию мРНК *SNCA*. В некоторых вариантах осуществления из-за модификации сахара ASO по изобретению обладает аффинностью связывания с последовательностью-мишенью РНК, которая усиливается 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).

Мономеры ASO, описанные в настоящем документе, связаны друг с другом через связывающие группы. Соответственно, каждый мономер связан с соседним 3' мономером через связывающую группу.

Специалисту в данной области будет понятно, что в контексте настоящего раскрытия 5' мономер на конце ASO не содержит 5' связывающую группу, хотя он может содержать или не содержать 5' концевую группу.

Термины «связывающая группа» и «межнуклеотидная связь» предназначены для обозначения группы, способной ковалентно связывать вместе два нуклеотида. Примеры включают фосфатные группы и фосфоротиоатные группы.

Примеры межнуклеотидных связей включают фосфодиэфирную связь, фосфотриэфирную связь, метилфосфонатную связь, фосфорамидатную связь, фосфоротиоатную связь и их комбинации. *См. также* WO2007/031091, которая включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

В одном аспекте ASO по изобретению нуклеотиды связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных групп.

Признано, что включение фосфодиэфирных связей, таких как одна или две связи, в фосфоротиоат ASO, в частности, между нуклеотидами или рядом с ними, может модифицировать биодоступность и/или биораспределение ASO - *см.* WO2008/113832, настоящим включенная в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, таких как вышеупомянутые варианты осуществления, где это применимо и специально не указано, все оставшиеся связывающие группы представляют собой фосфодиэфир или фосфоротиоат, или их смесь.

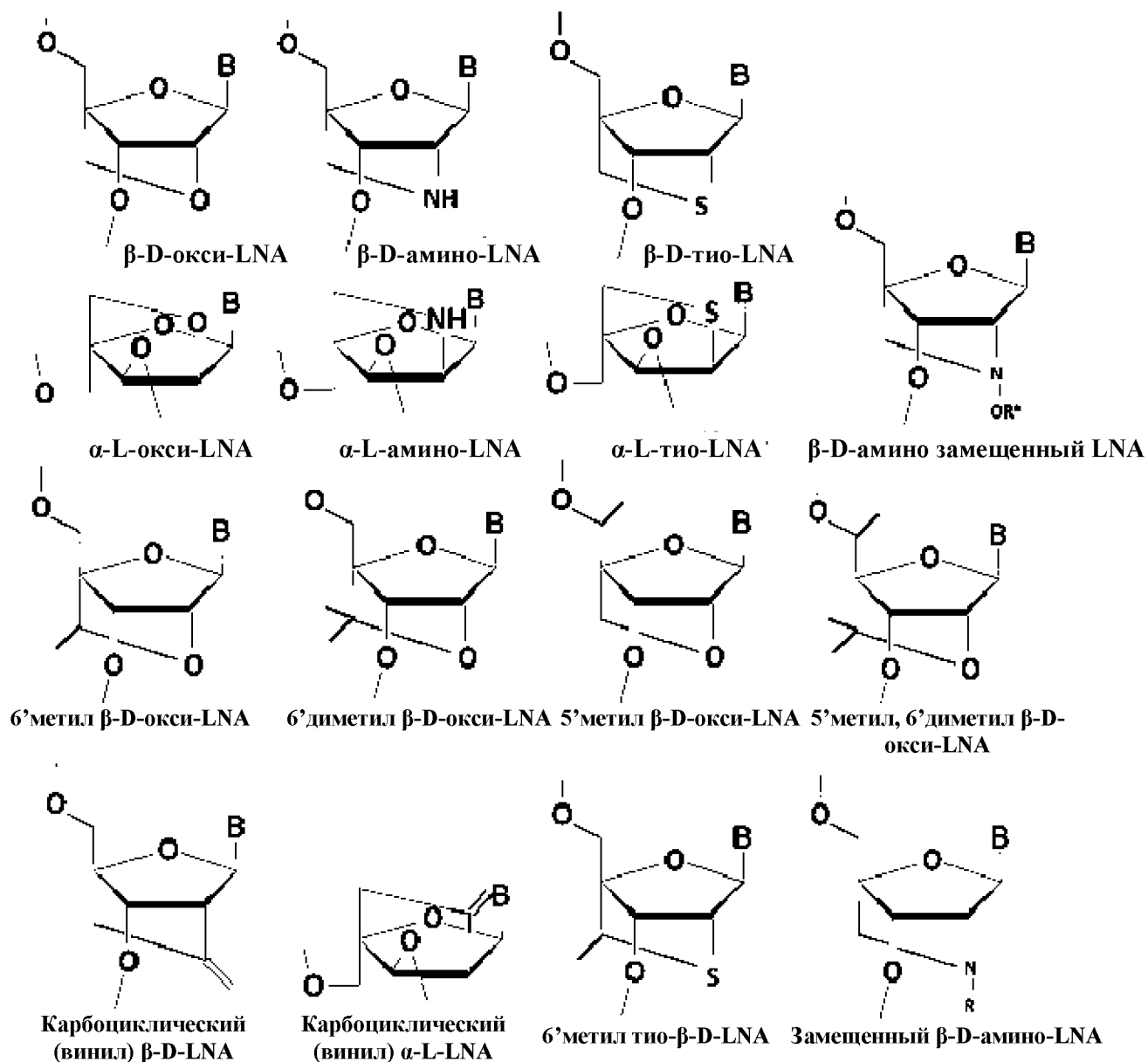
В некоторых вариантах осуществления все межнуклеотидные связывающие группы представляют собой фосфотиоат.

«LNA-нуклеозид» представляет собой 2'-модифицированный нуклеозид, который содержит бирадикал, связывающий C2' и C4' рибозного сахарного кольца указанного нуклеозида (также называемый «2'-4'-мостиком»), который ограничивает или блокирует конформацию рибозного кольца. Эти нуклеозиды в литературе также называются мостиковой нуклеиновой кислотой или бициклической нуклеиновой кислотой (BNA). Блокировка конформации рибозы связана с повышенной аффинностью гибридизации (дуплексная стабилизация), когда LNA вводится в олигонуклеотид для комплементарной молекулы РНК или ДНК. Обычно это можно определить путем измерения температуры плавления дуплекса олигонуклеотид/комплемент.

Неограничивающие примеры LNA-нуклеозидов раскрыты в WO 99/014226, WO 00/66604, WO 98/039352, WO 2004/046160, WO 00/047599, WO 2007/134181, WO 2010/077578, WO 2010/036698, WO 2007/090071, WO 2009/006478, WO 2011/156202, WO 2008/154401, WO 2009/067647, WO 2008/150729, Morita et al., *Bioorganic & Med.Chem. Lett.* 12, 73-76, Seth et al. *J. Org. Chem.* 2010, Vol 75(5) pp. 1569-81, и Mitsuoka et al., *Nucleic Acids Research* 2009, 37(4), 1225-1238, и Wan and Seth, *J. Medical Chemistry* 2016, 59, 9645–9667.

Другие неограничивающие иллюстративные LNA-нуклеозиды показаны на схеме 1.

Схема 1



В конкретном варианте осуществления LNA, пригодный для раскрытия, представляет собой бета-D-окси-LNA.

#### II.A. Конъюгаты

Используемый в настоящем документе термин конъюгат относится к ASO-005459, ковалентно связанному с нуклеотидным фрагментом.

Конъюгирование ASO-005459 с одним или несколькими нуклеотидными фрагментами может улучшить фармакологию ASO, *например*, путем воздействия на активность, клеточное распределение, клеточное поглощение или стабильность ASO. В некоторых вариантах осуществления фрагмент конъюгата модифицирует или усиливает фармакокинетические свойства ASO путем улучшения клеточного

распределения, биодоступности, метаболизма, экскреции, проницаемости и/или клеточного поглощения ASO. В частности, конъюгат может нацеливать ASO на конкретный орган, ткань или клеточный тип и тем самым повышать эффективность ASO в этом органе, ткани или клеточном типе. В то же время конъюгат может служить для снижения активности ASO в нецелевых типах клеток, тканях или органах, *например*, нецелевой активности или активности в нецелевых типах клеток, тканях или органах. В WO 93/07883 и WO2013/033230 предлагаются подходящие фрагменты конъюгата. Дополнительные подходящие фрагменты конъюгата представляют собой такие фрагменты, которые способны связываться с рецептором асиалогликопротеина (ASGPr). В частности, тривалентные конъюгаты N-ацетилгалактозамина являются пригодными для связывания с ASGPr, *см.*, например, WO 2014/076196, WO 2014/207232 и WO 2014/179620.

Конъюгаты ASO и их синтез также были описаны во всеобъемлющих обзорах Manoharan в *Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications*, S.T. Crooke, ed., Ch. 16, Marcel Dekker, Inc., 2001 and Manoharan, *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, 2002, 12, 103.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидный фрагмент (фрагмент конъюгата) выбирают 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.B. Активированные ASO

Термин «активированный ASO», используемый в настоящем документе, относится к ASO по настоящему изобретению, который ковалентно связан (*т.е.* функционализирован) по меньшей мере с одним функциональным фрагментом, который обеспечивает ковалентное связывание ASO с одним или несколькими конъюгированными фрагментами, *т.е.* фрагментами, которые сами не являются нуклеиновыми кислотами или мономерами, для образования конъюгатов, описанных в настоящем документе. Как правило, функциональный фрагмент будет содержать химическую группу, которая способна ковалентно связываться с ASO, *например*, через 3'-гидроксильную группу или экзоциклическую NH<sub>2</sub>-группу основания аденина, спейсер, который может быть гидрофильным, и концевую группу, которая способна связываться с конъюгированным фрагментом (*например*, аминогруппа, сульфгидрильная или гидроксильная группа). В некоторых вариантах осуществления

эта концевая группа не защищена, *например* представляет собой NH<sub>2</sub>-группу. В других вариантах осуществления концевая группа защищена, например, любой подходящей защитной группой, такой как группы, описанные в "Protective Groups in Organic Synthesis" by Theodora W Greene and Peter G M Wuts, 3rd edition (John Wiley & Sons, 1999).

В некоторых вариантах осуществления ASO-005459 функционализируют на 5'-конце, чтобы обеспечить ковалентное присоединение конъюгированного фрагмента к 5'-концу ASO. В других вариантах осуществления ASO по изобретению может быть функционализирован на 3'-конце. В еще других вариантах осуществления ASO по изобретению может быть функционализирован вдоль основной цепи или на фрагменте гетероциклического основания. В еще других вариантах осуществления ASO по настоящему изобретению может быть функционализирован в более чем одном положении, независимо выбранном из 5'-конца, 3'-конца, основной цепи и основания.

В некоторых вариантах осуществления активированный ASO по изобретению синтезируют путем включения во время синтеза одного или нескольких мономеров, которые ковалентно связаны с функциональной группой. В других вариантах осуществления активированный ASO по настоящему изобретению синтезируют с использованием мономеров, которые не были функционализированы, и ASO функционализируют после завершения синтеза.

### III. Фармацевтические композиции и пути введения

ASO-005459 можно применять в фармацевтических составах и композициях. Соответственно, такие композиции содержат фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, соль или адъювант.

ASO-005459 может быть включен в единицу дозирования, например, в фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель в количестве, достаточном для доставки пациенту терапевтически эффективного количества, не вызывая серьезных побочных эффектов у подвергаемого лечению пациента. Однако в некоторых формах терапии серьезные побочные эффекты могут быть приемлемыми при обеспечении положительного результата терапевтического лечения.

Составленное лекарственное средство может содержать фармацевтически приемлемые связывающие вещества и адъюванты. Капсулы, таблетки или пилюли могут содержать, например, следующие соединения: микрокристаллическую целлюлозу, камедь или желатин в качестве связывающих веществ; крахмал или лактозу в качестве вспомогательных веществ; стеараты в качестве смазывающих веществ;

различные подсластители или ароматизаторы. В случае капсул единица дозирования может содержать жидкий носитель, такой как жирные масла. Аналогично, частью такой единицы дозирования может быть сахарное или энтеросолюбильное покрытие. Олигонуклеотидные составы также могут представлять собой эмульсии, состоящие из активных фармацевтических ингредиентов и липида, образующего мицеллярную эмульсию.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить несколькими способами в зависимости от того, желательна ли местное или системное лечение, и в зависимости от области, подлежащей лечению. Введение может быть (a) пероральным, (b) пульмональным, *например*, путем ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, включая введение с помощью ингалятора; интратрахеальным, интраназальным; (c) местным, включая эпидермальное введение, чрезкожное введение, офтальмологическое введение и введение в слизистую оболочку, включая вагинальное и ректальное введение; или (d) парентеральным, включая внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию; или внутрочерепным, например, интратекальным, интрацеребровентрикулярным или интравентрикулярным введением. В одном варианте осуществления ASO-005459 вводят внутривенно, внутрибрюшинно, перорально, местно или в виде болюсной инъекции или вводят непосредственно в орган-мишень. В некоторых вариантах осуществления ASO-005459 вводят интратекально или интрацеребровентрикулярно в виде болюсной инъекции.

Фармацевтические композиции и составы для местного применения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, спреи, суппозитории, жидкости и порошки. При этом необходимыми или желательными могут быть стандартные фармацевтические носители, водные порошкообразные или масляные основы, загустители и т.п. Примеры составов для местного применения включают препараты, в которых ASO-005459 присутствует в смеси с агентом для местной доставки, таким как липиды, липосомы, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, стероиды, хелатообразующие агенты и поверхностно-активные вещества. Композиции и составы для перорального введения включают, но не ограничиваются ими, порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или в безводной среде, капсулы, гелевые капсулы, саше, таблетки или минитаблетки. Композиции и составы для парентерального, интратекального, интрацеребровентрикулярного или внутрижелудочкового введения могут включать

стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки, такие как, но без ограничения, усилители проникновения, соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или вспомогательные вещества.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают, но без ограничения, растворы, эмульсии и составы, содержащие липосомы. Эти композиции могут быть получены из множества компонентов, которые включают, но без ограничения, предварительно приготовленные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. Доставка лекарственного средства в ткань-мишень может быть улучшена с помощью носителей, включая, но без ограничения, катионные липосомы, циклодекстрины, производные порфирина, дендримеры с разветвленной цепью, полиэтилениминовые полимеры, наночастицы и микросферы (Dass CR. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54(1):3-27).

Фармацевтические составы по настоящему изобретению, которые в целях удобства могут быть представлены в виде единичной лекарственной формы, могут быть получены в соответствии с общепринятыми методиками, хорошо известными в фармацевтической промышленности. Такие методики включают стадию объединения активных ингредиентов с фармацевтическим(и) носителем(ями) или вспомогательным(и) веществом(ами). Как правило, составы получают путем однородного и тщательного смешивания активных ингредиентов с жидкими носителями или с тонкоизмельченными твердыми носителями, либо с теми и другими, а затем, если это необходимо, формования полученного продукта.

Для парентерального, подкожного, внутрикожного или местного введения состав может включать стерильный разбавитель, буферы, регуляторы тоничности и антибактериальные средства. Активные ASO могут быть приготовлены в комбинации с носителями, которые защищают против деградации или быстрого выведения из организма, включая имплантаты или микрокапсулы со свойствами контролируемого высвобождения. Для внутривенного введения носителями могут представлять собой физиологический раствор или забуференный фосфатом солевой раствор. В международной публикации WO2007/031091 (A2), опубликованной 22 марта 2007 года, дополнительно предлагаются подходящие фармацевтически приемлемые разбавители, носители и адьюванты, которые включены в настоящее описание посредством ссылки.

IV. Диагностика

Это раскрытие дополнительно обеспечивает способ диагностики, который можно применять при диагностике связанных с SNCA заболеваний, *например*, синуклеинопатии. Неограничивающие примеры синуклеинопатии включают, но без ограничения, болезнь Паркинсона, деменцию при болезни Паркинсона (PDD), деменцию с тельцами Леви и множественную системную атрофию.

ASO-005459 можно применять для измерения экспрессии транскрипта *SNCA* в ткани или биологических жидкостях, полученных от индивидуума, и сравнения измеренного уровня экспрессии со стандартным уровнем экспрессии транскрипта *SNCA* в нормальной ткани или биологических жидкостях, при этом увеличение уровня экспрессии по сравнению со стандартом свидетельствует о нарушении, поддающемся лечению с помощью ASO-005459.

ASO-005459 можно применять для анализа уровней транскриптов *SNCA* в биологическом образце с использованием любых способов, известных специалистам в данной области. (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» подразумевается любой биологический образец, полученный от индивидуума, линия клеток, культура ткани или другой источник клеток, потенциально экспрессирующих транскрипт *SNCA*. Способы получения тканей путем биопсии и биологических жидкостей у млекопитающих хорошо известны в данной области.

#### V. Наборы, содержащие ASO

Данное раскрытие дополнительно обеспечивает наборы, которые содержат ASO-005459, описанный в настоящем документе, и которые можно применять для выполнения способов, описанных в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления набор содержит по меньшей мере ASO-005459 в одном или нескольких контейнерах. В некоторых вариантах осуществления наборы содержат все компоненты, необходимые и/или достаточные для выполнения анализа на обнаружение, включая все контроли, инструкции по выполнению анализов и любое необходимое программное обеспечение для анализа и представления результатов. Специалист в данной области техники легко поймет, что ASO-005459 может быть легко включен в один из установленных форматов набора, которые хорошо известны в данной области.

#### VI. Способы применения

ASO-005459 можно применять в терапевтических и профилактических целях. SNCA представляет собой белок из 140 аминокислот, преимущественно



экспрессируемый в нейронах на пресинаптических терминалах, где, как полагают, он играет роль в регуляции синаптической передачи. Предполагается, что в естественных условиях он существует в виде как несвернутого мономера, так и стабильного тетрамера, состоящего из  $\alpha$ -спиралей, и как было показано, подвергается нескольким посттрансляционным модификациям. Одной модификацией, которая была тщательно изучена, является фосфорилирование SNCA по аминокислоте серину 129 (S129). Обычно только небольшой процент SNCA конститутивно фосфорилируется по S129 (pS129), тогда как подавляющее большинство SNCA, обнаруженных в патологических внутриклеточных включениях, представляет собой SNCA pS129. Эти патологические включения состоят из агрегированных нерастворимых скоплений неправильно свернутых белков SNCA и являются характерной особенностью группы нейродегенеративных заболеваний, известных под общим названием синуклеинопатии (или  $\alpha$ -синуклеинопатии).

При синуклеинопатиях SNCA может формировать патологические агрегаты в нейронах, известные как тельца Леви, которые характерны как для болезни Паркинсона (PD), так и для деменции при болезни Паркинсона (PDD) и деменции с тельцами Леви (DLB). Таким образом, ASO-005459 может уменьшать количество патологических агрегатов SNCA или предупреждать образование патологических агрегатов SNCA. Кроме того, в олигодендроцитах обнаруживаются патологические очаги, богатые SNCA, называемые глиальными цитоплазматическими включениями (GCI), которые являются характерным признаком быстро прогрессирующей фатальной синуклеинопатии, известной как множественная системная атрофия (MSA). В некоторых вариантах осуществления ASO-005459 уменьшает количество GCI или предупреждает образование GCI. Сообщения о недетектируемых или низких уровнях экспрессии мРНК SNCA в олигодендроцитах позволяют предположить, что некоторая патологическая форма SNCA распространяется от нейронов, где наблюдается высокая экспрессия, к олигодендроцитам. В некоторых вариантах осуществления ASO-005459 уменьшает или предупреждает распространение SNCA, *например*, патологической формы SNCA, от нейронов.

ASO-005459 можно применять в исследованиях, *например*, для специфического ингибирования синтеза белка SNCA (обычно путем деградации или ингибирования мРНК и тем самым предотвращения образования белка) в клетках и экспериментальных животных, тем самым облегчая функциональный анализ мишени или оценку его полезности в качестве мишени для терапевтического вмешательства.

Кроме того, обеспечены способы подавления экспрессии мРНК *SNCA* и/или белка *SNCA* в клетках или тканях, включающие контактирование клеток или тканей *in vitro* или *in vivo* с эффективным количеством ASO-005459, конъюгатов или композиций по изобретению.

Что касается терапевтических средств, животное или человека, подозреваемых в наличии заболевания или нарушения, которое можно лечить путем модулирования экспрессии транскрипта *SNCA* и/или белка *SNCA*, подвергают лечению путем введения ASO-005459 в соответствии с настоящим раскрытием. Кроме того, предлагаются способы лечения млекопитающего, например, лечение человека, подозреваемого в наличии или склонности к заболеванию или состоянию, связанному с экспрессией транскрипта *SNCA* и/или белка *SNCA*, путем введения терапевтически или профилактически эффективного количества ASO-005459 или композиций по изобретению. ASO, конъюгат или фармацевтическую композицию в соответствии с изобретением обычно вводят в эффективном количестве. В некоторых вариантах осуществления ASO или конъюгат по изобретению применяют в терапии.

Изобретение дополнительно обеспечивает ASO-005459 для применения в лечении одного или нескольких заболеваний, упомянутых в настоящем документе, таких как заболевание, выбранное из группы, состоящей из болезни Паркинсона, деменции при болезни Паркинсона (PDD), деменции с тельцами Леви, множественной системной атрофии и любых их комбинаций.

Изобретения дополнительно обеспечивает способ лечения  $\alpha$ -синуклеинопатий, при этом способ включает введение эффективного количества ASO, конъюгатов или их фармацевтических композиций животному, нуждающемуся в этом (такому как пациент, нуждающийся в этом).

В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние связано со сверхэкспрессией транскрипта гена *SNCA* и/или белка *SNCA*.

Изобретения также обеспечивает способы ингибирования (*например*, путем снижения) экспрессии транскрипта гена *SNCA* и/или белка *SNCA* в клетке или ткани, при этом способ включает контактирование клетки или ткани *in vitro* или *in vivo* с эффективным количеством ASO, конъюгатов или их фармацевтических композиций по изобретению для достижения снижения экспрессии транскрипта гена *SNCA*, тем самым снижая уровень белка *SNCA*.

В некоторых вариантах осуществления ASO-005459 применяют для снижения экспрессии мРНК *SNCA* в одном или нескольких отделах мозга, *например*, гиппокампе,

стволе мозга, полосатом теле или любых их комбинациях. В других вариантах осуществления ASO-005459 снижает экспрессию мРНК *SNCA*, например, в стволе 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 носителя (без ASO) на день 3, день 5, день 7, день 10, день 14, день 15, день 20, день 21 или день 25. В некоторых вариантах осуществления экспрессия мРНК *SNCA* поддерживается 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 носителя (без ASO) в течение до 28 дней, 30 дней, 32 дней, 35 дней, 40 дней, 42 дней, 45 дней, 49 дней, 50 дней, 56 дней, 60 дней, 63 дней, 70 дней или 75 дней.

В других вариантах осуществления ASO-005459 снижает экспрессию мРНК *SNCA* и/или белка *SNCA* в медулле, дорсальном стриатуме, варолиевом мосте, мозжечке, поясничном отделе спинного мозга, лобной доле и/или любых их комбинациях.

Изобретение также обеспечивает применение ASO-005459 или конъюгата по изобретению для изготовления лекарственного средства. Изобретение также обеспечивает композицию, содержащую ASO-005459 или его конъюгат, для применения в лечении нарушения, как указано в настоящем документе, или способ лечения нарушения, как указано в настоящем документе. Настоящее изобретение также обеспечивает ASO-005459 или конъюгаты для применения в терапии. Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает ASO-005459 или конъюгаты для применения в лечении синуклеинопатии.

Изобретение дополнительно обеспечивает способ ингибирования белка *SNCA* в клетке, которая экспрессирует *SNCA*, включающий введение ASO-005459 или конъюгата в соответствии с изобретением в клетку, чтобы таким образом воздействовать на ингибирование белка *SNCA* в клетке.

Изобретение включает способ уменьшения, ослабления, предупреждения или лечения нейрональной гипервозбудимости у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение ASO-005459 или конъюгата в соответствии с изобретением.

Изобретение также обеспечивает способ лечения нарушения, как указано в настоящем документе, при этом способ включает введение ASO-005459 или конъюгата в соответствии с изобретением, как описано в настоящем документе, и/или

фармацевтической композиции в соответствии с изобретением пациенту, нуждающемуся в этом.

ASO-005459 и другие композиции в соответствии с изобретением можно применять для лечения состояний, связанных со сверхэкспрессией или экспрессией мутированной версии белка SNCA.

Изобретение обеспечивает ASO-005459 или конъюгат в соответствии с изобретением для применения в качестве лекарственного средства, например, для лечения  $\alpha$ -синуклеинопатий. В некоторых вариантах осуществления  $\alpha$ -синуклеинопатия представляет собой заболевание, выбранное из группы, состоящей из болезни Паркинсона, деменции при болезни Паркинсона (PDD), деменции с тельцами Леви, множественной системной атрофии и любых их комбинаций.

Изобретение дополнительно обеспечивает применение ASO-005459 в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания, нарушения или состояния, как указано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ASO-005459 или его конъюгат применяют для изготовления лекарственного средства для лечения  $\alpha$ -синуклеинопатии, эпилепсии или их комбинации.

В целом, один аспект изобретения относится к способу лечения млекопитающего, страдающего или подверженного состояниям, связанным с аномальными уровнями SNCA (*m.e.*  $\alpha$ -синуклеинопатия), включающему введение млекопитающему терапевтически эффективного количества ASO, как описано в настоящем документе.

Заболевание или нарушение, как указано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления может быть связано с мутацией в гене *SNCA* или гене, белковый продукт которого связан или взаимодействует с белком SNCA. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мРНК-мишень представляет собой мутированную форму последовательности *SNCA*.

Интересный аспект изобретения направлен на применение ASO-005459, как определено в настоящем документе, или конъюгата, как определено в настоящем документе, для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания, нарушения или состояния, как указано в настоящем документе.

Способы по настоящему изобретению можно применять для лечения или профилактики заболеваний, вызванных аномальными уровнями белка SNCA. В некоторых вариантах осуществления заболевания, вызванные аномальными уровнями белка SNCA, представляют собой  $\alpha$ -синуклеинопатии. В некоторых вариантах

осуществления  $\alpha$ -синуклеинопатии включают болезнь Паркинсона, деменцию при болезни Паркинсона (PDD), деменцию с тельцами Леви и множественную системную атрофию.

Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления изобретение, кроме того, относится к способу лечения аномальных уровней белка SNCA, при этом способ включает введение ASO-005459 или конъюгата по изобретению, или фармацевтической композиции по изобретению пациенту, нуждающемуся в этом.

Изобретение также относится к ASO-005459, композиции или конъюгату, как определено в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного средства.

Изобретение, кроме того, относится к применению соединения, композиции или конъюгата, как определено в настоящем документе, для изготовления лекарственного средства для лечения аномальных уровней белка SNCA или экспрессии мутантных форм белка SNCA (таких как аллельные варианты, например тех, которые связаны с одним из заболеваний, упомянутых в настоящем документе).

Пациент, который нуждается в лечении, представляет собой пациента, страдающего или вероятно страдающего заболеванием или нарушением.

При осуществлении настоящего изобретения будут использованы, если не указано иное, традиционные методы клеточной биологии, клеточной культуры, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК и иммунологии, известные специалистам в данной области. Такие методики подробно описаны в литературе. См., например, Sambrook *et al.*, ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd 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*; Mullis *et al.* U.S. Pat. No. 4,683,195; 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 ссылки, цитированные выше, а также все ссылки, цитированные в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте.

Следующие примеры предлагаются в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

### Примеры

#### Пример 1: Конструирование ASO-005459

Описанный в настоящем документе ASO (*m.e.*, ASO-005459) разрабатывали для нацеливания на место соединения между интроном 1 и экзоном 2 пре-мРНК *SNCA* (*m.e.* нуклеотиды 7604-7620 SEQ ID NO: 1). ASO-005459 был разработан как гэтмер (*например*, чередующийся гэтмер) и содержит закрытые нуклеиновые кислоты - LNA (заглавные буквы), бета-дезоксид LNA на 5'-конце и 3'-конце, и фосфоротиоатную основную цепь. Но основная цепь может представлять собой основную цепь других типов (*например*, фосфодиэфирная связь, фосфотриэфирная связь, метилфосфонатная связь, фосфорамидатная связь или их комбинации).

ASO по настоящему изобретению синтезировали с использованием способов, хорошо известных в данной области. Иллюстративные способы получения таких ASO описаны в Barciszewski *et al.*, Chapter 10 – " Locked Nucleic Acid Aptamers" in *Nucleic Acid and Peptide Aptamers: Methods and Protocols*, vol. 535, Gunter Mayer (ed.) (2009), полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

#### Пример 2. Многопараметрический анализ (High Content Assay) для измерения снижения уровня белка SNCA в первичных нейронах

ASO-005459 тестировали на его способность снижать экспрессию белка SNCA в первичных нейронах мыши. Первичные нейрональные культуры получали из переднего мозга мышей PAC-Tg(*SNCA*<sup>A53T</sup>)<sup>+/+</sup>; *SNCA*<sup>-/-</sup> ("PAC-A53T"), несущих полностью человеческий ген *SNCA* с мутацией A53T на мышинном фоне с нокаутом *SNCA*. См. Куо Y *et al.*, *Hum Mol Genet.*, 19: 1633-50 (2010). Все процедуры с участием мышей проводили в соответствии с Методами испытаний на животных (Animal Test Methods, ATM), утвержденными Bristol-Myers Squibb Animal Care and Use Committee (ACUC). Первичные нейроны генерировали путем расщепления папаином в

соответствии с протоколом производителя (Worthington Biochemical Corporation, LK0031050). Изолированные нейроны промывали и ресуспендировали в нейробазальной среде Neurobasal medium (NBM, Invitrogen), дополненной B27 (Gibco), 1,25 мкМ Glutamax (Gibco), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 25 мкг/мл амфотерицина В.

Клетки высевали в многолуночные планшеты, покрытые поли-D-лизином, в количестве 5400 клеток/см<sup>2</sup> (например, в 384-луночные планшеты в количестве 6000 клеток/лунку в 25 мкл NBM). ASO разводили в воде и добавляли к клеткам через DIV01 (*m.e.* через 1 день после посева). ASO добавляли до 2х конечной концентрации в среде, затем доставляли к клеткам вручную. Альтернативно, ASO в воде распределяли с использованием акустической диспенсерной станции Labcyte ECHO. Для распределения с помощью ECHO 250 нл ASO в воде добавляли к клеткам в среде с последующим добавлением аликвоты равного объема, представляющей собой свежую аликвоту NBM. Для первичного скрининга ASO добавляли до конечных концентраций 5 мкМ, 3,3 мкМ, 1 мкМ, 200 нМ или 40 нМ. Для определения активности готовили 8-10 точечные титрования ASO из 0,75 мМ исходного раствора, затем доставляли к культивируемым клеткам с получением конечных концентраций в диапазоне 2,7-4000 нМ или 4,5-10000 нМ. ASO-000010 (TCTgtcttggctTTG, SEQ ID NO: 5) и ASO-000838 (AGAAataagtggtAGT, SEQ ID NO: 6) (5 мкМ) включали в каждый планшет в качестве эталонных контрольных ингибиторов для тубулина и SNCA, соответственно. Клетки инкубировали с ASO в течение 14 дней для достижения устойчивого снижения мРНК.

После 14-дневной инкубации клетки фиксировали путем добавления в лунки фиксатора до конечных концентраций 4% формальдегида (J.T. Baker) и 4% сахарозы (Sigma). Клетки фиксировали в течение 15 минут, а затем фиксатор аспирировали из лунок. Затем клетки пермеабелизировали в течение 20 минут фосфатно-буферным солевым раствором (PBS), содержащим 0,3% Triton-X 100 и 3% бычьего сывороточного альбумина (BSA) или 3% нормальной козьей сыворотки. После этого из лунок аспирировали буфер для пермеабелизации и клетки один раз промывали PBS. Первичные антитела затем разводили в PBS, содержащем 0,1% Triton X-100 и 3% BSA. Использовали разведения 1:1000 кроличьих антител против SNCA (Abcam) и 1:500 куриных антител против тубулина (Abcam). Клетки инкубировали с первичными антителами в течение от 2 часов до ночи. После инкубации окрашивающий раствор для первичных антител аспирировали и клетки промывали 2 раза PBS. В лунки вносили вторичный окрашивающий раствор, содержащий в разведении 1:500 козы антитела к

иммуноглобулинам курицы, конъюгированные с флуоресцентным красителем Alexa 567, козьи антитела к иммуноглобулинам кролика, конъюгированные с Alexa 488, и Hoechst (10 мкг/мл) в PBS, содержащем 0,1% Triton X-100 с 3% BSA, и планшеты инкубировали в течение 1 часа. После этого вторичный окрашивающий раствор аспирировали из лунок и клетки промывали 3 раза PBS. После промывания клеток в каждую лунку вносили 60 мкл PBS. Затем планшеты хранили в PBS до визуализации.

Для визуализации планшеты сканировали на системе Thermo-Fisher (Cellomics) CX5 с использованием программы Spot Detector Bio-Application (Cellomics) для количественного определения ядер (краситель Hoechst, канал 1), удлинений тубулина (Alexa 567, канал 2) и SNCA (Alexa 488, канал 3). Количество объектов (ядер) наблюдали, но не публиковали в базе данных. Общую площадь, покрытую тубулином, количественно оценивали как функцию SpotTotalAreaCh2, и общую интенсивность окрашивания на SNCA количественно оценивали как SpotTotalIntenCh3. Измерение тубулина было включено для мониторинга токсичности. Для определения снижения уровня белка SNCA рассчитывали отношение интенсивности SNCA к площади окрашивания тубулина и результаты нормализовали как медиану % ингибирования, используя медиану для лунок, обработанных носителем, в качестве общего значения, и лунки ASO-000010 или ASO-000838 в качестве максимально ингибированных лунок для тубулина или SNCA, соответственно.

Пример 3: Анализ QUANTIGENE® (96-луночный анализ) для измерения снижения мРНК в нейронах человека

Способность ASO-005459 снижать мРНК SNCA человека и/или возможные нецелевые виды мРНК человека измеряли *in vitro* с помощью анализа QUANTIGENE®. Нейроны человека (Cellular Dynamics Inc., «iNeurons») оттаивали, высевали и культивировали в соответствии со спецификациями производителя. Эти iNeurons представляют собой популяцию человеческих нейронов высокой чистоты, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых (iPS) клеток с использованием собственных протоколов дифференцировки и очистки Cellular Dynamic.

Лизис: Клетки высевали в 96-луночные планшеты, покрытые поли-L-орнитин/ламинином в количестве 50000-10000 клеток на лунку (в зависимости от экспрессии исследуемой мишени) и поддерживали в нейробазальной среде, дополненной B27, Glutamax и пенициллин-стрептомицином. ASO разводили в воде и добавляли к клеткам DIV01 (*m.e.* через 1 день после посева). Для единичных измерений обычно использовали конечную концентрацию ASO, равную 0,5 мкМ. Для



определения  $IC_{50}$  нейроны обрабатывали разведениями 1:4 с построением семиточечной кривой концентрация-ответ с самой высокой концентрацией 5 мкМ. Затем клетки инкубировали при 37°C и 5%  $CO_2$  в течение 6 дней для достижения устойчивого снижения уровня мРНК.

После инкубации среду удаляли и клетки промывали 1X в DPBS и лизировали следующим образом. Измерение содержания матричной РНК в лизате проводили с использованием системы реагентов QUANTIGENE<sup>®</sup> 2.0 Reagent System (AFFYMETRIX<sup>®</sup>), позволяющей количественно оценить РНК методом амплификации сигнала (метод «разветвленной» ДНК), основанным на специально разработанном наборе зондов захвата РНК. Рабочий буферный раствор для лизиса клеток готовили путем добавления 50 мкл протеиназы К к 5 мл предварительно нагретой (37°C) смеси для лизиса Lysis mix и разбавляли в  $dH_2O$  до конечного разведения 1:4. Рабочий буфер для лизиса вносили в планшеты (от 100 до 150 мкл/лунку в зависимости от экспрессии исследуемой мишени), растирали 10 раз, герметично закрывали и инкубировали в течение 30 мин при 55°C. После лизиса лунки растирали еще 10 раз и планшеты хранили при -80°C или сразу же анализировали.

Анализ. В зависимости от конкретного используемого зонда захвата (*m.e.* SNCA, PROS1 или тубулин) лизаты разбавляли (или не разбавляли) в смеси для лизиса. Затем лизаты добавляли в планшеты для захвата (96-луночные полистирольные планшеты, покрытые зондами захвата) в общем объеме 80 мкл/лунку. Реагенты для рабочего набора зондов получали путем объединения воды, не содержащей нуклеазу (12,1 мкл), смеси для лизиса (6,6 мкл), блокирующего реагента (1 мкл) и специального набора зондов 2.0 (0,3 мкл) (SNCA человека, номер по каталогу SA-50528, PROS1 человека, номер по каталогу SA-10542 или бета-3 тубулин человека, номер по каталогу SA-15628) в соответствии с инструкциями производителя (QUANTIGENE<sup>®</sup> 2.0 AFFYMETRIX<sup>®</sup>). Затем 20 мкл реагентов для рабочего набора зондов добавляли к 80 мкл разведения лизата (или 80 мкл смеси для лизиса для исходных образцов) на планшете для захвата. Планшеты центрифугировали при 240g в течение 20 секунд и затем инкубировали в течение 16-20 часов при 55°C для гибридизации (захват РНК-мишени).

Амплификацию сигнала и детекцию РНК-мишени начинали с промывки планшетов 3 раза буфером (300 мкл/лунку) для удаления любого несвязанного вещества. Затем добавляли реагент для гибридизации 2.0 Pre-Amplifier 2.0 (100 мкл/лунку), инкубировали при 55°C в течение 1 часа, затем аспирировали и добавляли

промывочный буфер, и аспирировали 3 раза. Затем, как описано, добавляли реагент для гибридизации 2.0 Amplifier (100 мкл/лунку), инкубировали в течение 1 часа при 55°C и стадию промывания повторяли, как описано ранее. Затем добавляли реагент для гибридизации 2.0 Label Probe (100 мкл/лунку), инкубировали в течение 1 часа при 50°C и стадию промывания повторяли, как описано ранее. Планшеты снова центрифугировали при 240g в течение 20 секунд, чтобы удалить любой избыток промывочного буфера, и затем к планшетам добавляли 2.0 Substrate (100 мкл/лунку). Планшеты инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре, а затем планшеты визуализировали на многоканальном ридере PerkinElmer Envision в режиме люминометра в течение 15 минут.

Определение данных: Для интересующего гена средний в анализе фоновый сигнал вычитали из среднего сигнала каждого технического повтора. Средние сигналы за вычетом фона для интересующего гена затем нормализовали к среднему сигналу за вычетом фона для РНК домашнего хозяйства (housekeeping RNA) тубулина. Процент ингибирования для обработанного образца рассчитывали относительно лизата контрольного обработанного образца. Результаты анализов QUANTIGENE® для клеток, обработанных ASO, показаны, *например*, на фигуре 3.

Пример 4: Анализ QUANTIGENE® (96-луночный анализ) для измерения снижения уровня мРНК в клетках Ramos

Для измерения возможного снижения уровня мРНК нецелевого IKZF3 (цинковый палец 3 семейства IKAROS), использовали клетки Ramos (линия лимфоцитарных клеток человека). Поскольку клетки Ramos не экспрессируют *SNCA*, *RB1* (RB, транскрипционный корепрессор 1), который экспрессируется в клетках Ramos, использовали в качестве положительного контроля для оценки ASO-опосредованного нокдауна экспрессии мРНК IKZF3. Два ASO синтезировали для связывания и нокдауна экспрессии мРНК RB1 человека. Бета-2-микроглобулин ( $\beta 2M$ ) использовали в качестве контрольного гена домашнего хозяйства. Клетки Ramos выращивали в суспензии в среде RPMI, дополненной FBS, глутамином и пенициллином/стрептомицином.

Лизис. Клетки высевали на 96-луночные планшеты, покрытые поли-L-орнитин/ламинином в количестве 20000 клеток на лунку и поддерживали в нейробазальной среде, содержащей B27, GlutaMax и пенициллин-стрептомицин. ASO разбавляли водой и добавляли к клеткам через 1 день после посева (DIV01) до конечной концентрации 1 мкМ. После обработки ASO клетки инкубировали при 37°C в

течение 4 дней для достижения устойчивого снижения уровня мРНК. После инкубации среду удаляли и клетки лизировали следующим образом. Измерение содержания матричной РНК в лизате проводили с использованием системы реагентов QUANTIGENE® 2.0 Reagent System (AFFYMETRIX®), которая количественно оценивает РНК с использованием метода амплификации сигнала (метод «разветвленной» ДНК), основанного на специально разработанном наборе зондов захвата РНК. Смесь для лизиса (QUANTIGENE® 2.0 AFFYMETRIX®) предварительно нагревали в инкубаторе при 37°C в течение 30 минут. Для лизиса клеток в суспензии к 200 мкл клеток в суспензии добавляли 100 мкл 3X буфера для лизиса (содержащего 10 мкл/мл протеиназы К). Затем клетки растирали 10 раз для лизиса, планшет герметично закрывали и инкубировали в течение 30 мин при 55°C. После этого лизаты хранили при -80°C или сразу же анализировали.

Анализ: В зависимости от используемого конкретного зонда захвата (*m.e.* IKZF3, RB1 и β2M) лизаты разбавляли (или не разбавляли) в смеси для лизиса. Затем лизаты вносили в планшет для захвата (96-луночный полистирольный планшет, покрытый зондами захвата) в общем объеме 80 мкл/лунку. Реагенты для рабочих наборов зондов получали путем объединения 12,1 мкл воды, не содержащей нуклеаз, 6,6 мкл смеси для лизиса, 1 мкл блокирующего реагента, 0,3 мкл специфического набора зондов 2.0 (IKZF3 человека, номер по каталогу SA-17027, RB1 человека, номер по каталогу SA-10550 или бета-2 микроглобулин, номер по каталогу SA-10012) в соответствии с инструкциями производителя (QUANTIGENE® 2.0 AFFYMETRIX®). Затем 20 мкл реагентов для рабочего набора зондов добавляли к 80 мкл разведения лизата (или 80 мкл смеси для лизиса для исходных образцов) на планшете для захвата. Затем планшеты инкубировали в течение 16-20 часов при 55°C для гибридизации (захват РНК-мишени). Амплификацию сигнала и обнаружение РНК-мишени начинали с промывки планшетов буфером 3 раза (300 мкл/лунку) для удаления любого несвязанного вещества. Затем добавляли реагент для гибридизации 2.0 Pre-Amplifier 2.0 (100 мкл/лунку), инкубировали при 55°C в течение 1 часа, затем аспирировали и добавляли промывочный буфер, и аспирировали 3 раза. Затем, как описано, добавляли реагент для гибридизации 2.0 Amplifier (100 мкл/лунку), инкубировали в течение 1 часа при 55°C и стадию промывки повторяли, как описано ранее. Затем добавляли реагент для гибридизации 2.0 Label Probe (100 мкл/лунку), инкубировали в течение 1 часа при 50°C и стадию промывания снова повторяли, как описано ранее. Планшеты снова центрифугировали при 240g в течение 20 секунд, чтобы удалить избыток

промывочного буфера, и затем к планшетам добавляли 2.0 Substrate (100 мкл/лунку). Планшеты инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре, а затем визуализировали на многоканальном ридере PerkinElmer Envision в режиме люминометра в течение 15 минут.

Определение данных: Для интересующего гена средний в анализе фоновый сигнал (*т.е.* без лизата, только 1X буфер для лизиса) вычитали из среднего сигнала каждого технического повтора. Средние сигналы за вычетом фона для интересующего гена затем нормализовали к среднему сигналу за вычетом фона для РНК домашнего хозяйства (housekeeping RNA) (для клеток Ramos это бета-2-микроглобулин). Процент ингибирования для обработанного образца рассчитывали относительно среднего значения лизата необработанного образца. Результаты анализов QUANTIGENE® для клеток, обработанных ASO-005459, показаны в таблице 4.

Пример 5: Анализ qPCR для измерения снижения уровня мРНК *SNCA* в клетках SK-N-BE(2)

ASO-005459, нацеленный на *SNCA*, тестировали на его способность снижать экспрессию мРНК *SNCA* в клетке нейробластомы SK-N-BE(2) человека, полученной из ATCC (CRL-2271).

Клетки SK-N-BE(2) выращивали в среде для культивирования клеток (MEM [Sigma, номер по каталогу M2279], дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой [Sigma, номер по каталогу F7524], 1x Glutamax™ [Sigma, номер по каталогу 3050-038], 1x раствором MEM незаменимых аминокислот [Sigma, номер по каталогу M7145] и 0,025 мг/мл гентамицина [Sigma, номер по каталогу G1397]). Клетки трипсинизировали каждые 5 дней путем промывки фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) [Sigma, номер по каталогу 14190-094] с последующим добавлением 0,25% раствора трипсина в EDTA (Sigma, T3924), инкубацией в течение 2-3 минут при 37°C и растиранием перед посевом клеток. Клетки поддерживали в культуре на протяжении до 15 пассажей.

Для экспериментального использования 12500 клеток на лунку высевали в 96-луночные планшеты (Nunc, номер по каталогу 167008) в 100 мкл ростовой среды. Олигонуклеотиды получали из 750 мкМ исходного раствора. ASO, растворенный в PBS, добавляли приблизительно через 24 часа после того, как клетки высевали до конечной концентрации 25 мкМ для однократных исследований. Клетки инкубировали в течение 4 дней без какой-либо замены среды. Для определения активности готовили 8 концентраций ASO в конечном диапазоне концентраций 16-

50000 нМ. ASO-004316 (CcAAAtcttataataACtAC, SEQ ID NO: 7) и ASO-002816 (TTCctttacaccACAC, SEQ ID NO: 8) были включены в качестве контролей.

После инкубации клетки собирали путем удаления среды с последующим добавлением 125 мкл буфера для лизиса PURELINK<sup>®</sup> Pro 96 Lysis buffer (Invitrogen 12173.001A) и 125 мкл 70% этанола. РНК очищали в соответствии с инструкцией производителя и элюировали в конечном объеме 50 мкл воды, что привело к концентрации РНК 10-20 нг/мкл. РНК разбавляли в 10 раз водой перед одностадийной реакцией qPCR. Для одностадийной реакции qPCR qPCR-смесь (qScript TMXLE 1-step RT-qPCR TOUGHMIX<sup>®</sup> Low ROX от QuantaBio, номер по каталогу 95134-500) смешивали с двумя зондами Taqman в соотношении 10:1:1 (смесь qPCR: зонд 1: зонд 2) для генерации мастер-микса. Зонды Taqman приобретали у фирмы LifeTechnologies: SNCA: Hs01103383\_m1; PROS1: Hs00165590\_m1; TBP: 4325803; GAPDH 4325792. Мастер-микс (6 мкл) и РНК (4 мкл, 1-2 нг/мкл) затем смешивали в планшете qPCR (MICROAMP<sup>®</sup> оптический 384-луночный, 4309849). После герметичного закрытия планшет быстро вращали, 1000g в течение 1 минуты при комнатной температуре, и переносили в систему ViiATM 7 (Applied Biosystems, Thermo), и использовали следующие условия PCR: 50°C в течение 15 минут; 95°C в течение 3 минут; 40 циклов: 95°C в течение 5 секунд с последующим снижением температуры со скоростью 1,6°C/сек, а затем 60°C в течение 45 секунд. Данные анализировали с использованием программного обеспечения QuantStudioTM Real\_time PCR.

Пример 6: Анализ *in vitro* ASO-005459 в отношении уменьшения мРНК SNCA человека

Активность ASO-005459 в нейронах мыши

Используя способы, описанные выше в примере 2, ASO-005459 тестировали на его способность снижать экспрессию белка SNCA в результате снижения уровня мРНК SNCA. Вкратце, первичные нейроны, полученные от мышей PAC-A53T, обрабатывали ASO-005459 или контрольными ASO в течение 14 дней. Затем клетки фиксировали и измеряли уровни белка SNCA и белка тубулина с помощью многопараметрического анализа «High Content Imaging». Уровни тубулина измеряли для мониторинга токсичности и нормализации снижения уровня белка SNCA.

Как показано ниже таблице 1, инкубация клеток с 4 нМ ASO-005459 привела к снижению на 21% экспрессии белка SNCA. При 40 нМ и 5 мкМ ASO-005459 экспрессия белка SNCA снижалась на 84% и 86%, соответственно. Напротив, ASO-

005459 оказывал минимальный эффект на уровень экспрессии белка тубулина или эффект отсутствовал.

**Таблица 1: Активность ASO-005459 в нейронах A53T-РАС**

ASO-005459 концентрация	$\alpha$ Syn/туб %ингиб.	SD	N	Туб. %ингиб.	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 = количество тестов

Для дальнейшей оценки активности нейроны A53T-РАС обрабатывали 10-точечным титрованием ASO-005459, как описано выше в примере 2А, и определяли значения IC<sub>50</sub> для эффекта на белки SNCA и тубулина. Как показано на фигурах 2А и 2В, и в таблице 2 (ниже), наблюдалось зависимое от концентрации уменьшение отношения  $\alpha$ -Syn/тубулин со средним значением IC<sub>50</sub> 7,4 нМ. Это наблюдение согласуется с данными однократной активности, показанными в таблице 1 (выше). Более того, ASO-005459 оказал незначительное влияние на уровни Tub. Взятые вместе, эти результаты показывают, что ASO-005459 эффективно снижает уровни белка SNCA с минимальным влиянием на общую жизнеспособность клеток.

**Таблица 2: Активность и селективность, оцененные для ASO-005459, в отношении SNCA и белка тубулина в нейронах A53T-РАС**

aSyn/туб IC <sub>50</sub> (нМ)	SD	N	туб IC <sub>50</sub> (нМ)	SD	N
7,42	2,73	6	>4000	NA	5

SD = стандартное отклонение

N = количество тестов

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

Используя способ, описанный в примере 5, ASO-005459 тестировали на его способность снижать уровень мРНК SNCA в SK-N-BE(2) после 4-дневного лечения.

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

Активность ASO-005459 в человеческих нейронах

Активность ASO-005459 в отношении SNCA подтверждали с использованием первичных нейронов человека, как описано выше в примере 3. Вкратце, нейроны человека получали из индуцированных плюрипотентных стволовых (iPS) клеток. Клетки обрабатывали ASO-005459 или контрольными ASO в течение 6 дней, а затем измеряли уровни мРНК с помощью анализа QUANTIGENE®. Поскольку нейроны человека также экспрессируют PROS1, потенциальную мишень для ASO-005459, уровень мРНК *PROS1* также измеряли для оценки эффекта ASO-005459 на нецелевые гены. Дополнительно измеряли мРНК тубулина (*TUBB*) для мониторинга токсичности.

Как показано на фиг. 3 и в таблице 3 (ниже), ASO-005459 индуцировал зависимое от концентрации снижение *SNCA*, экспрессируемого в нейронах человека, со средним значением  $IC_{50}$  100 нМ. Это значение  $IC_{50}$  в ~13 раз ниже, чем значение  $IC_{50}$  для снижения уровня белка SNCA в нейронах PAC-A53T (таблица 2, выше). Причина такого сдвига активности не ясна, но может быть обусловлена различиями в поглощении ASO, метаболизме или кинетике нокдауна SNCA. Несмотря на то, что ASO-005459 также продемонстрировал зависимое от концентрации снижение уровня мРНК *PROS1* в нейронах человека; значение  $IC_{50}$  оказалось в 30-50 раз ниже, чем значение  $IC_{50}$  для *SNCA*. Эти результаты подтверждают активность ASO-005459 в отношении *SNCA* в нейронах человека и указывают на то, что ASO-005459 является 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 нейронах человека**

Дата анализа	Партия	<i>SNCA</i> $IC_{50}$ (нМ)	<i>PROS1</i> $IC_{50}$ (нМ)	<i>TUBB3</i> $IC_{50}$ (нМ)	<i>PROS1/SNCA</i> отношение $IC_{50}$
8/26/2016	01-001	42	2127	>5000	51
12/8/2016	01-004	157	>5000	>5000	>32

Партия = номер конкретной партии используемого ASO-005459

Активность ASO-005459 в клетках Ramos

IKZF3 представляет собой еще одну потенциальную мишень для ASO-005459, но, в отличие от *PROS1*, он не экспрессируется в нейронах человека. Вместо этого, IKZF3 устойчиво экспрессируется в клетках Ramos, лимфоцитарной клеточной линии человека. Клетки Ramos обрабатывали 1 мкМ ASO-005459 и измеряли эффект на экспрессию мРНК IKZF3. Для контроля токсичности также измеряли мРНК бета-2 микроглобулина. Поскольку клетки Ramos не экспрессируют *SNCA*, другой ген, RB1

(транскрипционный корепрессор 1 RB), использовали в качестве положительного контроля для опосредованного ASO нокадауна. ASO-006754 (GGTgaggtttggaGA, SEQ ID NO: 9) и ASO-006755 (GGTgaggtttgtagaAG, SEQ ID NO: 10) нацелены на RB1 и были включены в исследование. Как показано в таблице 4 (ниже), при концентрации 1 мкМ ASO-005459 не влиял на экспрессию мРНК IKZF3, демонстрируя специфичность ASO-005459 в отношении SNCA. ASO-005459 также не влиял на экспрессию мРНК RB1 и  $\beta 2M$ , что указывает на то, что ASO-005459 не токсичен для клеток Ramos. Напротив, ASO-006754 и ASO-006755 (контрольные ASO) снижали уровни RB1 на 87% и 83%, соответственно, подтверждая активность ASO в клетках Ramos.

**Таблица 4: Эффект 1 мкМ ASO-005459 на IKZF3 в клетках Ramos**

ASO	Мишень	Партия	IKZF3 (%кон)	RB1 (%кон)	$\beta 2M$ (%кон)
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 = номер конкретной партии используемого ASO

В совокупности, представленные в настоящем документе результаты 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 показывают, что ASO-005459 хорошо переносится как в мышинных, так и в человеческих нейронах. Эти данные поддерживают дальнейшую разработку ASO-005459 в качестве модифицирующего заболевание терапевтического средства для лечения синуклеинопатий.

#### Пример 7. Переносимость *in vivo* и снижение уровня мРНК SNCA *in vivo*

Переносимость *in vivo* ASO по настоящему изобретению тестировали, чтобы понять, как переносится ASO при инъекции в различные животные модели (*m.e.* мышам и яванским макакам).

#### Мыши

*Субъекты:* Самцов и самок (в возрасте 2-3 месяца) мышей PAC-Tg(SNCA<sup>A53T</sup>)<sup>+/+</sup>;SNCA<sup>-/-</sup> ("PAC-A53T"), несущих полностью человеческий ген SNCA с мутацией A53T на генетическом фоне мыши с нокаутом SNCA, использовали для краткосрочных, долгосрочных и PK/PD *in vivo* исследований эффективности. В



некоторых случаях мышей дикого типа (WT) C57B/6 использовали для долгосрочной (*m.e.*, 4 недели) оценки состояния здоровья. Мышей содержали в группах по 4 или 5 штук в помещении с контролируемой температурой с неограниченным доступом к пище и воде. Все процедуры с участием мышей проводили в соответствии с Методами испытаний на животных (Animal Test Methods, ATM), утвержденными Bristol-Myers Squibb Animal Care and Use Committee (ACUC).

*Подготовка раствора для дозирования ASO.* Для получения растворов для дозирования использовали шприцы со стерильным солевым раствором (1 мл), снабженные 0,2 мкм фильтрами Whatman, и центрифужные пробирки, свободные от нуклеаз. Указанный объем воды или солевого раствора добавляли к порошку ASO и перемешивали на вортексе (~1 мин) для растворения порошка ASO. Затем раствор оставляли на 10 минут и снова перемешивали на вортексе в течение ~1 минуты. Пробирки недолго центрифугировали для возврата всей жидкости на дно пробирки, а затем раствор фильтровали через стерильный фильтр 0,2 мкм во вторую пробирку без РНКаз. Небольшую аликвоту исходного раствора разбавляли до 1 мг/мл для анализа концентрации с использованием Nanodrop. Аналитический образец трижды перемешивали на вортексе с переворачиванием вручную для тщательного перемешивания. Затем УФ-поглощение образца измеряли дважды при 260 нм с помощью Nanodrop (подставку ополаскивали и вытирали три раза перед нанесением образца). Тестовый образец отбрасывали после завершения анализа. Образец считался готовым к дозированию, если поглощение УФ находилось в диапазоне между 90% и 110% образца. Если УФ-поглощение превышало 110% образца, готовили вторичное разбавление; если поглощение составляло <90%, образец готовили с более высокой начальной концентрацией, и далее следовали аналогичные стадии, описанные выше. Образцы хранили при 4°C до использования.

*Интрацеребровентрикулярная инъекция (ICV) методом «freehand».* Инъекцию ICV выполняли с использованием микрошприца Hamilton, снабженного иглой 27 или 30 калибра, в соответствии с методом Haley и McCormick. Игла была снабжена полиэтиленовой защитой на расстоянии 2,5-3 мм от кончика, чтобы ограничить ее проникновение в мозг. Мышей анестезировали с использованием анестетика изофлурана (1-4%). После достаточного обезболивания мышей держали за вялую кожу шеи на спине большим и первым пальцами одной руки. Прилагая мягкое, но сильное давление, голову животного затем обездвиживали, прижимая к твердой ровной поверхности. Дозирование проводили с использованием 10 мкл шприцев Гамильтон,

снабженных иглой 27½ калибра. Затем кончик иглы вводили через скальп и череп, примерно на 1 мм латерально и на 1 мм каудально от уровня брегмы (*m.e.* справа от средней линии, примерно на 3 мм назад, если измерять от линии глаза). После позиционирования иглы ASO вносили в объеме 5 мкл в солевой раствор в качестве носителя и вводили в течение ~30 секунд. Иглу оставляли на месте на 5-10 секунд перед удалением. Мышей возвращали в их домашнюю клетку и оставляли для восстановления на ~2-4 мин. Мышей наблюдали непрерывно в течение 30 минут сразу после дозирования для выявления побочных поведенческих эффектов лекарственного средства и/или дозирования. В течение этого времени любую мышь, у которой судорога наблюдалась более 3 раз, немедленно подвергали эвтаназии и присваивали автоматический балл 20. Переносимость лекарственного средства оценивали через 1 ч ± 15 мин после дозирования. Животных, которые продемонстрировали непереносимость после введения соединений (оценка переносимости >4), умерщвляли сразу же после проведения оценки через 1 час.

*Оценка переносимости ASO.* Животных, которых дозировали ASO, оценивали сразу после дозирования и наблюдали в течение 2 часов на предмет любых побочных эффектов. Для краткосрочных исследований переносимости (AT) мышей оценивали во время дозирования и снова через 3 дня после инъекции ASO. Для долгосрочной оценки состояния здоровья мышей еженедельно взвешивали и наблюдали на наличие каких-либо проблем со здоровьем и поведением до завершения эксперимента. Мышей, у которых потеря веса составляла более 15% от их первоначальной массы тела или проявлялись проблемы, связанные с переносимостью, исключали из исследований и подвергали эвтаназии. Оценки состояния здоровья и переносимости проводили в соответствии со следующей таблицей:

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

Категория	Балл 1	Балл 2	Балл 3	Балл 4
<b>Гиперактивность, стереотипии, поведение в домашней клетке</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Очень незначительно увеличено исследование домашней клетки или вертикальной двигательной активности по сравнению с контролями</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Увеличено исследование домашней клетки (напр., копание, зарывание, и т.д.)</li> <li>•Увеличен уход за шерстью</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Умеренно увеличено исследование домашней клетки</li> <li>•Детектируемые стереотипии (напр., движение по кругу, повторяющиеся движения, ит.д.)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Значительная гиперактивность</li> <li>•Значительные стереотипии</li> </ul>

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

Категория	Балл 1	Балл 2	Балл 3	Балл 4
<b>Пониженная настороженность, исследование и отвечаемость</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Некоторое снижение исследовательской активности</li> <li>•Отвечают нормально на стимуляцию</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Сонливость</li> <li>•Немного пониженная реакция на дотрагивание или манипулирование</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Ступор (пониженная отвечаемость, пониженный корнесальный рефлекс)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Кома (нет ответа на стимуляцию, напр., сжатие), нет корнесального рефлекса</li> </ul>
<b>Двигательная координация и сила</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Умеренное изменение походки и силы сжатия (падение через 5-10)</li> <li>•Нет падений, нормальный выпрямительный ответ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Уменьшение силы сжатия (падение менее чем через 5 сек)</li> <li>•Умеренная атаксия (напр., медленный выпрямительный ответ, покачивание)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Высоко сниженная сила сжатия (падение менее чем через 2 сек)</li> <li>•Атаксия (напр., шатание, падение, нарушенная походка)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Серьезная атаксия (напр., ползание, падение с бруса)</li> <li>•Не может выпрямиться</li> </ul>
<b>Осанка, внешний вид, дыхание</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Очень незначительно отклоняющаяся от нормы осанка (слабовыраженное отклонение)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Незначительно отклоняющаяся от нормы осанка (напр., сгорбленное, вытянутое, низкая осанка, положение хвоста, хвост Штрауба)</li> <li>•Пилоэрекция или птоз</li> <li>•неопрятный наружный покров</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Умеренно отклоняющаяся от нормы осанка (напр., животное лежит на животе и не может встать)</li> <li>•Поверхностное дыхание</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Значительно отклоняющаяся от нормы осанка (напр., животное лежит на боку)</li> <li>•Паралич лицевого нерва (напр., слюнотечение, высунутый язык)</li> <li>•Затрудненное дыхание</li> </ul>
<b>Тремор, гиперактивность, конвульсии</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Детектируемый тремор</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Гиперотвечаемость на стимул to stimuli (напр., шум)</li> <li>•Значительный тремор</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Незначительное количество или парциальные, подъем на задние лапы и падение как часть конвульсий</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Повторяющиеся или судорожные приступы (бегущие, подпрыгивающие, клонические и/или тонические)</li> </ul>

<sup>a</sup>Нормальный оценивается как "0". Животных оценивали на индивидуальной основе в последовательные моменты времени после дозирования. Наблюдение осуществляли через 1 ч ± 15 мин, затем через 24 ч ± 2 ч, затем через 7 дней (при необходимости). Конвульсии подсчитывали для момента времени 1 час, даже если они возникали до окна наблюдения. Балл общей переносимости рассчитывали на основе суммы баллов по отдельным категориям с максимально возможным баллом 20.

*Сбор тканей.* После окончательной оценки поведения и здоровья мышей обезглавливали на гильотине, и быстро удаляли мозг. Каждый мозг разделяли на два полушария и а) гиппокамп рассекали для измерений мРНК в 3-дневных краткосрочных

исследованиях переносимости; b) гиппокамп, ствол мозга и полосатое тело из одного полушария иссекали для измерений мРНК, тогда как те же самые участки иссекали из второго полушария для измерений белка/ПК в РК/PD исследованиях зависимости доза-ответ во времени.

В некоторых исследованиях кровь и спинномозговую жидкость (CSF) также собирали для измерений РК (кровь) и РК/белок (CSF). Для сбора крови и CSF мышей глубоко анестезировали изофлураном (4%). Кровь собирали путем пункции сердца с использованием иглы 23 калибра. 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 4500xg в течение 10 минут при 4°C. Затем плазму удаляли и помещали в 0,5 мл пробирки Эппендорфа и хранили при -80°C до использования. Для сбора CSF грудную полость открывали, обнажая сердце, и отбирали столько крови, сколько необходимо, чтобы избежать загрязнения CSF. Образцы CSF собирали из цистерны magna с использованием микропипеток и помещали в пробирки типа Эппендорф, Protein LoBind. Затем пробирки центрифугировали при 4500xg в течение 15 минут при 4°C. CSF осторожно переносили в чистые пробирки типа Эппендорф LoBind объемом 0,5 мл и хранили при -80°C до последующего использования.

Данные по яванскому макаку

*Субъект:* Использовали самцов яванских макаков весом 3,5-10,0 кг в начале исследования. Каждому имплантировали интратекальный катетер для доступа к спинномозговой жидкости (CSF), путем введения на уровне позвонков L3 или L4. Дистальный кончик полиуретанового катетера проходил в интратекальном пространстве до приблизительно L1 позвонка. Проксимальный конец был соединен с подкожным портом доступа, расположенным в нижней части спины животного. Животных оставляли для заживления в течение по меньшей мере двух недель перед началом исследования. Уход за лабораторными животными осуществлялся в соответствии с Политикой общественного здравоохранения по вопросам гуманного ухода и использования лабораторных животных и Руководством по уходу и использованию лабораторных животных NRC (2011) (Национальный исследовательский совет: Руководство по уходу и использованию лабораторных животных (The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health). National Academies Press (US), Washington (DC)). Протокол был одобрен Wallingford Animal Care and Use Committee of the Bristol-Myers Squibb Company.

*Взятие образцов CSF и крови:* Доступ к порту CSF осуществлялся подкожно с использованием асептических методов, и взятие проб CSF проводили у бодрствующих животных, сидящих в вертикальном положении в кресле для удержания приматов. Приблизительно 0,1 мл CSF отбрасывали в начале сбора, чтобы очистить мертвое пространство в катетере и порте. CSF собирали посредством самотёка до максимума 0,5 мл CSF на образец. CSF вращали 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.

Пробы крови брали из доступной вены, обычно из подкожной вены. Образцы крови готовили в несколько процедур в зависимости от конкретного показателя. Для плазмы кровь собирали в пробирки, обработанные EDTA. Для сыворотки, кровь собирали в пробирки для отделения сыворотки и оставляли сворачиваться в течение по меньшей мере 30 минут перед центрифугированием. Для измерения свертывания и факторов свертывания кровь собирали в цитратные пробирки, а для анализа РНК кровь позже собирали в пробирки, содержащие РНК. После обработки образцы замораживали на сухом льду или в жидком азоте и хранили замороженными до анализа.

*Инtrateкальное дозирование.* Животных обучали дозированию во время бодрствования и с использованием модифицированных коммерчески доступных удерживающих кресел, животных поддерживали в положении лежа. Антисмысловые олигонуклеотиды (ASO), нацеленные на *SNCA*, растворяли в солевом растворе, стерилизовали фильтрацией и вводили со скоростью 0,33 мл/мин в объеме 1,0 мл с последующим промыванием 0,5 мл стерильной воды. Общее время инфузии составило 4,5 мин. Животные оставались в положении лежа в течение 30 минут после вливания.

*Вскрытие:* Яванским макакам вводили соответствующий объем коммерчески доступного раствора для эвтаназии под анестезией кетаминем и/или изофлураном. Сразу же после аутопсии получали ткани и мозг переносили на влажный лед для иссечения. Представляющие интерес участки иссекали, используя 4-6 мм срезы в ASI Cuno Brain Matrix, а также методы «свободной руки». Образцы помещали свежими в RNAlater® или замораживали на сухом льду для последующего анализа. Ткань CNS быстро иссекали у яванских макаков, и кусочки длиной не более 4 мм по любой оси собирали и помещали позже в 5 мл РНК. Образцы хранили при 4°C в течение ночи, затем при -20°C для хранения до анализа.

Анализируемые области головного мозга включали медуллу, варолиев мост, средний мозг, мозжечок, дорсальный стриатум (слева и справа), гиппокамп (слева и

справа), лобную кору (слева и справа), височную кору (слева и справа), теменную кору (слева и справа), затылочную кору (слева и справа) и корковое белое вещество. Кроме того, спинной мозг был взят из шейного, грудного и поясничного отделов. Образцы также были собраны из печени, почек и сердца. В некоторых случаях собирали образцы ядер тройничного нерва, большеберцового нерва и аорты для изучения нецелевой фармакологии в этих областях.

*Количественное определение с помощью анализа ELISA концентрации ASO в мышинной или обезьяньей ткани, плазме и CSF:*

Ткань гомогенизировали с плазмой и водой в соотношении 1:1. Стандартную кривую генерировали путем 2-кратного серийного разбавления от 5000 до 4,9 нМ в плазме (для плазмы и CSF) и в смеси плазма:вода (для образцов тканей), а затем дополнительно разбавляли до 5000-кратного разбавления с помощью взятого отдельно 5X SSCT (750 мМ NaCl, и 75 мМ цитрата натрия, pH 7,0, содержащий 0,05% (об/об) Твин-20) и в 5X SSCT, содержащем реагенты захвата при концентрации 35 нМ и реагенты для детекции при концентрации 35 нМ, чтобы получить стандартный диапазон 1–1000 пМ. Используемый коэффициент разбавления варьировался в зависимости от предполагаемого диапазона концентраций образца. Зонд захвата представлял собой AAAGGAA с 3' Biotin (Exiqon), и зонд для детекции представлял собой 5' DigN-изопропил 18 линкер--GTGTGGT (Exiqon).

Экспериментальные образцы и стандарты добавляли в буфер для лизиса Clarity (Phenomenex, номер по каталогу AL0-8579) в соотношении 1:1 перед разведением буфером для захвата и детекции и перед переносом на планшет для ELISA. Образцы CSF разбавляли плазмой (в 2 раза) перед добавлением буфера для лизиса. Планшет, покрытый стрептавидином (Thermo 15119), промывали 3 раза 5X SSCT-буфером. Добавляли 100 мкл образцов и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Зонд для детекции, 100 мкл анти-Dig-AP Fab-фрагмента, разведенного 1:4000 в PBS, содержащем 0,05% Твин-20 (Roche Applied Science, номер по каталогу 11 093 274 910), добавляли и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. После промывания планшета 2X SSCT-буфером в течение 30 минут при комнатной температуре добавляли 100 мкл субстрата Tropix CDP-star Sapphire II (Applied Biosystems). Концентрации ASO измеряли с помощью люминесценции (Enspire-PerkinElmer).

*Измерения белка альфа-синуклеина:*

Образцы ткани мозга гомогенизировали при 10 мл/г ткани в буфере RIPA (50 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% додецилсульфата натрия) с использованием шарикового гомогенизатора Qiagen TissueLyser II в течение 25 циклов/сек с шариком из нержавеющей стали 5 мм в течение 2 минут. Гомогенизированные образцы инкубировали 30 мин на льду. Аликвоты по 50 мкл каждого образца оставляли для анализа РК. Оставшиеся образцы центрифугировали при 20800 г в течение 60 мин при 4°C. Супернатант сохраняли и использован для анализа. Общий белок измеряли с использованием набора для анализа белка Pierce BCA (23227).

Экстракты ткани мозга: Белок SNCA измеряли с использованием ELISA MJFR1+4B12. Вкратце, планшеты для ELISA (Costar) покрывали 100 мкл анти-SNCA-антитела MJFR1 (Abcam) в концентрации 0,1 мкг/мл, разведенной в ВирН карбонат-бикарбонатном буфере, рН 9,4 (Thermo Scientific) в течение ночи (O/N) при 4°C. На следующий день планшеты 4 раза промывали PBS Дульбекко (Life Technologies) и блокировали 3% BSA (бычий сывороточный альбумин, не содержащий протеазы, фракция V, Roche Diagnostic) в PBS в течение 2-3 часов при комнатной температуре (RT) или в течение ночи при 4°C. Как стандарты, так и образцы головного мозга разбавляли смесью 1% BSA/0,05% Tween/PBS, содержащим ингибитор протеазы Roche (Roche 11836145001, 1 гранула/25 мл) и ингибитор фосфатазы 2 и 3 (Sigma, 1:100). В качестве стандарта использовали SNCA дикого типа (rPeptide). Образцы загружали в двух повторах (50 мкл/лунку) и инкубировали в течение ночи (O/N) при 4°C. После уравнивания планшетов до комнатной температуры в каждую лунку добавляли 50 мкл детектирующего антитела 4B12 (Biolegend) (разведенного 1:4000 в 1% BSA/0,1% Твин/DPBS) и совместно инкубировали с образцами при комнатной температуре в течение ~2 ч. Детектирующее антитело предварительно конъюгировали с щелочной фосфатазой (набор AP от Novus Biologicals). Затем планшеты 4 раза промывали 0,05% Tween/PBS и развивали с помощью 100 мкл субстрата щелочной фосфатазы (Tropix CDP Star Ready-to-Use with Sapphire II, T-2214, Life Technologies) в течение 30 минут. Интенсивность люминесценции измеряли с помощью Perkin Elmer EnVision (2102 Multilabel Reader). Планшеты постоянно встряхивали (шейкер Titer, скорость 3) во время анализа. Данные анализировали с использованием GraphPad Prism. Общий белок в ткани головного мозга измеряли с использованием набора Micro protein assay kit (Thermofisher #23235) в соответствии с инструкциями производителя.

*Спинномозговая жидкость (CSF):* Белок SNCA измеряли с использованием набора U-PLEX Human SNCA Kit: (номер по каталогу K151WKK-2, Meso Scale Discovery) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы CSF разбавляли в 10 раз. Гемоглобин измеряли в образцах CSF с использованием набора Abcam mouse Hemoglobin ELISA kit (ab157715). Образцы CSF разводили в 40 раз для измерения гемоглобина.

#### *Измерения мРНК с помощью qRT-PCR*

Области мозга собирали и помещали в 1,5 мл пробирки RNA-later Tissue Protect tubes (Qiagen, номер по каталогу 76514), которые были предварительно заполнены RNA-later, раствором для стабилизации РНК. Ткань в растворе RNA-later может храниться при 4°C в течение 1 месяца или при -20°C или -80°C в течение неопределенного времени.

*Выделение РНК: RNeasy Plus Mini Kit:* РНК из мышиногo гиппокампа и коры головного мозга изолировали с использованием набора RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, номер по каталогу 74134). Образцы ткани гомогенизировали в объеме 600 мкл или 1200 мкл буфера RLT Plus, содержащего 10 мкл/мл 2-меркаптоэтанола и 0,5% реагента Dх. 600 мкл буфера для лизиса использовали, если образец ткани был <20 мг, 1200 мкл буфера для лизиса использовали для образцов ткани >20 мг. Для гомогенизации образец ткани переносили в 2,0 мл круглодонную пробирку Eppendorf Safe-Lock tube (Eppendorf, номер по каталогу 022600044), содержащую 600 мкл буфера RLT Plus Buffer (плюс 10 мкл/мл 2-меркаптоэтанола и 0,5% реагента Dх), и шарики из нержавеющей стали 5 мм (Qiagen, номер по каталогу 69989). Образцы гомогенизировали с использованием прибора Qiagen TissueLyser II. Образцы обрабатывали в течение 2,0 мин при 20 Гц, образцы вращали на 180° и обрабатывали в течение еще 2,0 мин при 20 Гц. Затем образцы обрабатывали 2,0 мин при 30 Гц, образцы вращали на 180° и обрабатывали еще 2,0 мин при 30 Гц. Гомогенизацию использовали дольше и/или при более высокой частоте, если обработка не была завершена. Затем 600 мкл лизата ткани переносили в спин-колонку gDNA Eliminator в 2,0 мл пробирке для сбора и образцы центрифугировали в течение 30 с при 10000g. Все этапы центрифугирования проводили при комнатной температуре. Проточный поток собирали и добавляли равный объем 70% этанола и перемешивали. В спин-колонку RNeasy переносили 600 мкл, помещенные в пробирку для сбора 2,0 мл, и образцы центрифугировали в течение 15 секунд при 10000 g. Поток отбрасывали, а оставшиеся 600 мкл образца добавляли в спин-колонку. Спин-колонки центрифугировали, а



проточную часть отбрасывали. Колонки промывали 700 мкл промывочного буфера RW1, центрифугировали в течение 15 секунд при 10000g и проточную часть отбрасывали. Затем колонки промывали 2 раза 500 мкл буфера RPE, содержащего 4 объема этанола, как описано в протоколе набора. Колонки сначала центрифугировали в течение 15 секунд при 10000g для первой промывки, а затем в течение 2,0 мин при 10000g для второй промывки. После второй промывки колонки центрифугировали один раз в течение 1,0 мин при 10000g для сушки мембран. Колонки затем переносили в новую 1,5 мл пробирку для сбора и 30 мкл РНКазы без воды добавляли непосредственно к центру мембраны. Мембраны оставляли для инкубации в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем колонки центрифугировали в течение 1,0 мин при 10000g для элюирования РНК. Элюат, содержащий РНК, собирали и хранили на льду до определения концентраций РНК с помощью УФ-поглощения с использованием спектрофотометра NanoDrop (Thermo). Образцы РНК хранили при -80°C.

Выделение РНК: набор RNEASY<sup>®</sup> Plus Universal Mini Kit: РНК из всех других образцов тканей от яванского макака, мыши и крысы выделяли с помощью набора RNEASY<sup>®</sup> Plus Universal Mini Kit (Qiagen, номер по каталогу 73404). Для гомогенизации 50 мкг или менее образца ткани переносили в круглодонную пробирку Eppendorf с защелкой Safe-Lock объемом 2,0 мл (Eppendorf, номер по каталогу 022600044), содержащую 900 мкл реагента для лизиса QIAZOL<sup>®</sup> и шарики из нержавеющей стали диаметром 5 мм (Qiagen, номер по каталогу 69989). Образцы гомогенизировали с помощью гомогенизатора TissueLyser II, Qiagen. 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. Затем образцы обрабатывали в течение 2,0 мин при частоте 30 Гц, образцы поворачивали на 180° и обрабатывали еще в течение 2,0 мин при 30 Гц. Гомогенизацию в течение более длительного времени и/или при более высокой частоте использовали, если обработка не завершалась. Затем гомогенизированный лизат ткани переносили в новую круглодонную пробирку Eppendorf с защелкой Safe-Lock объемом 2,0 мл и оставляли при комнатной температуре на 5,0 мин. В каждую пробирку добавляли 100 мкл раствора элиминатора гДНК и пробирки энергично встряхивали в течение 30 сек. В каждую пробирку добавляли 180 мкл хлороформа (Sigma, номер по каталогу 496189) и пробирки энергично встряхивали в течение 30 сек. Пробирки оставляли при комнатной температуре на 3 минуты. Пробирки центрифугировали при 12000g в течение 15 мин при 4°C. После центрифугирования верхнюю водную фазу переносили в новую

круглодонную пробирку Eppendorf с защелкой Safe-Lock объемом 2,0 мл, ~500 мкл. Добавляли равный объем 70% этанола и перемешивали. Все последующие стадии центрифугирования проводили при комнатной температуре. 500 мкл переносили в спин-колонку RNeasy, помещенную в собирательную пробирку объемом 2,0 мл, и образцы центрифугировали в течение 15 секунд при 10000g. Фильтрат отбрасывали и оставшиеся 500 мкл образца добавляли в спин-колонку. Спин-колонки центрифугировали, фильтрат отбрасывали и колонки промывали 700 мкл промывочного буфера Wash Buffer RWT, содержащего 2 объема этанола. Колонки центрифугировали в течение 15 сек при 10000 g, фильтрат отбрасывали. Затем колонки дважды промывали 500 мкл буфера RPE, содержащего 4 объема этанола, как описано в протоколе набора. Колонки сначала центрифугировали в течение 15 сек при 10000 g для первой промывки, а затем в течение 2,0 мин при 10000 g для второй промывки. После второй промывки колонки центрифугировали один раз в течение 1,0 мин при 10000g для сушки мембран. Колонки затем переносили в новую собирательную пробирку объемом 1,5 мл и 30 мкл воды, не содержащей РНКазы, наносили непосредственно в центр мембраны. Мембраны оставляли для инкубации в течение 10 минут при комнатной температуре. Колонки центрифугировали в течение 1,0 мин при 10000 g для элюирования РНК. Элюаты, содержащие РНК, собирали и хранили на льду до определения концентрации РНК по УФ-поглощению с использованием спектрофотометра NanoDrop (Thermo). Образцы РНК хранили при -80°C.

Синтез кДНК с помощью обратной транскрипции: 300 нг РНК разводили до конечного объема 10,8 мкл, используя воду без нуклеаз (Invitrogen, номер по каталогу 10977-015), в микропланшете PCR-96-AB-C (Axugen, номер по каталогу 321-65-051). В каждую лунку добавляли 6,0 мкл реакционной смеси 1, содержащей следующие компоненты: 2,0 мкл случайных декамеров при концентрации 50 мкМ (Ambion, номер по каталогу AM5722G) и 4,0 мкл 1X смеси dNTP (Invitrogen, номер по каталогу 10297-018). Планшет герметизировали оптической герметизирующей лентой (Applied Biosystems, номер по каталогу 4360954) и центрифугировали в течение 1,0 мин при  $1000 \times g$  при комнатной температуре. Затем планшет нагревали в течение 3,0 мин при 70°C, используя 96-луночную систему Thermal Cycler GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Затем планшет полностью охлаждали на льду. Затем в каждую из лунок добавляли 3,25 мкл реакционной смеси 2 (содержащей 2 мкл 10X буфера для синтеза цепи кДНК, 1,0 мкл фермента обратной транскриптазы MMLV-RT 200 Ед/мкл (Ambion, номер по каталогу 2044) и 0,25 мкл ингибитора РНКазы 40 Ед/мкл (Ambion,

номер по каталогу AM2682)). Планшет герметизировали оптической уплотнительной лентой и центрифугировали в течение 1,0 мин при  $1000 \times g$  при комнатной температуре. Используя 96-луночный Thermal Cycler, планшет нагревали при  $42^{\circ}\text{C}$  в течение 60 мин, затем при  $95^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин. Затем планшеты охлаждали на льду. Планшеты с кДНК хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  до готовности к использованию для анализа PCR.

qPCR для амплификации и количественного определения экспрессии мРНК *SNCA* и *GAPDH*: кДНК разводили в 5 раз в свободной от нуклеаз воде в микропланшете PCR-96-AB-C. 16 мкл раствора Master Mix, состоящего из следующего: 10 мкл Taqman Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, номер по каталогу 4369016), 1,0 мкл 20X набора праймеров-зондов Taqman (Applied Biosystems) и 5,0 мкл воды без нуклеаз добавляли в каждую лунку 384-луночного оптического планшета для PCR (Applied Biosystems, номер по каталогу 4483315). В каждую лунку 384-луночного оптического планшета для PCR добавляли 4,0 мкл разведенной кДНК. Планшет герметизировали оптической уплотнительной лентой и центрифугировали в течение 1,0 мин при  $1000 \times g$  при комнатной температуре. PCR выполняли на системе Applied Biosystems 700 HT Fast Real-Time PCR System с использованием следующих параметров в стандартном режиме:  $50^{\circ}\text{C}$  в течение 2,0 мин,  $95^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин, затем 40 циклов при  $95^{\circ}\text{C}$  в течение 15 сек и  $60^{\circ}\text{C}$  в течение 1,0 мин.

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

- 1) альфа-синуклеин человека (номер по каталогу Hs01103383\_m1) с FAM-меткой;
- 2) *PROS1* человека (номер по каталогу HS00165590\_m1) с FAM-меткой;
- 3) Альфа-синуклеин яванского макака (номер по каталогу Mf02793033\_m1) с FAM-меткой;
- 4) *GAPDH* яванского макака (номер по каталогу Mf04392546\_g1) с FAM-меткой;
- 5) *GAPDH* яванского макака (номер по каталогу Mf04392546\_g1) с VIC-меткой Primer Limited;
- 6) крысиный альфа-синуклеин (номер по каталогу Rn01425141\_m1) с FAM-меткой;
- 7) крысиный *GAPDH* (номер по каталогу Rn01775763-g1) с FAM-меткой;
- 8) крысиный *GAPDH* (номер по каталогу 4352338E) с VIC-меткой Primer Limited;
- 9) мышинный *GAPDH* (номер по каталогу Mm99999915-g1) с FAM-меткой;
- 10) мышинный *GAPDH* (номер по каталогу 4352339E) с VIC-меткой Primer Limited.

Пример 8. Анализ активности *in vivo* и переносимости ASO-005459 у мышей.

ASO-005459 представляет собой LNA-модифицированный ASO, специфический в отношении человеческого *SNCA*. Результаты *in vitro* (описанные выше) демонстрируют, что ASO-005459 является мощным и селективным в отношении снижения уровня мРНК *SNCA* в первичных нейронах. Результаты *in vitro* также дают основание предположить, что ASO-005459 хорошо переносится.

#### Мыши A53T-РАС

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

Как показано в таблицах 6 и 7 (ниже), ASO-005459 хорошо переносился с общим средним показателем переносимости, равным 1. Кроме того, ASO-005459 значительно снижал уровни мРНК *SNCA* на >90% в гиппокампе через 3 дня после введения. (Фигура 4).

Таблица 6

	Оценка токсичности @1D	3D мРНК %KD	Оценка токсичности @28D	Оценка токсичности WT @28D
ASO-005459	0.50	90.83		0.00

Таблица 7: Переносимость ASO-005459 у мышей A53T-РАС, 3-дневное исследование

Животное#	Гиперактивность	Бдительность	Двигательная сила и координация	Осанка/дыхание	Тремор/судороги	Общий балл
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						1.00
SEM						1.00

Для оценки активности *in vivo* мышей A53T-РАС дозировали ASO-005459 при концентрации 3,13 мкг, 12,5 мкг, 25 мкг или 50 мкг посредством инъекции ICV. Переносимость оценивали путем измерения массы тела на 7 и 14 дни после

дозирования. Экспрессию мРНК *SNCA* оценивали через 14 дней после дозирования, когда животных умерщвляли и собирали их ткани. Нокдаун мРНК *SNCA* измеряли в трех областях мозга: гиппокампе, стволе мозга и полосатом теле. Ствол мозга и полосатое тело являются двумя областями, которые являются наиболее пораженными в головном мозге у пациентов с MSA и PD. В отдельном исследовании мышей C57BL/6 дозировали 100 мкг ASO-005459 и переносимость оценивали путем измерения массы тела животных на 7, 14, 21 и 28 дни после дозирования. Мышам C57BL/6 дикого типа (WT) вводили ICV 100 мкг ASO-005459 и в течение 4-недельного периода контролировали массу тела и поведение. У этих животных не измеряли снижение экспрессии мРНК *SNCA*, поскольку ASO-005459 не нацелен на *SNCA* мыши.

Как показано на фигурах 5A и 5B, отсутствовали значительные различия в массе тела мышей (как мышей A53T-РАС, так и мышей C57BL/6), получавших ASO-005459 (для всех концентраций), и мышей, получавших контрольный носитель. Животные (C57BL/6) не проявляли какого-либо отклоняющегося от нормы поведения на протяжении эксперимента. См. таблицу 8 (ниже). Такие результаты показывают, что ASO-005459 хорошо переносится. Кроме того, у мышей, получавших ASO-005459, наблюдалось значительное и дозозависимое снижение экспрессии мРНК *SNCA* во всех трех протестированных областях головного мозга. См. фигуры 6A-6C. В гиппокампе экспрессия мРНК *SNCA* была снижена на 53%, 73%, 80% и 96% для 3,13, 12,5, 25 и 50 мкг ASO-005459, соответственно. Схожие дозозависимые нокдауны также наблюдались в стволе мозга. В полосатом теле нокдауны мРНК *SNCA* были более переменными и менее устойчивыми по сравнению с другими областями (фигуры 6A-6C): 75% и 46% нокдаун наблюдался при 50 мкг и 25 мкг ASO-005459, соответственно. Однако при использовании 12,5 мкг и 3,13 мкг ASO-005459 не было значительного снижения экспрессии мРНК *SNCA*. Возможными объяснениями более низкой активности, наблюдаемой в полосатом теле, являются различия в уровнях ASO или кинетике нокдауна мРНК *SNCA*.

**Таблица 8: Переносимость ASO-005459 в 28-дневном исследовании**

Живот-нос#	Временная точка (день)	Гиперактивность	Бдительность	Двиг. сила и коорд	Осанка/дыхание	Тремор/судороги	Общий балл
26	1	0	0	0	0	0	0
26	28	0	0	0	0	0	0
27	1	0	0	0	0	0	0

**Таблица 8: Переносимость ASO-005459 в 28-дневном исследовании**

Животное#	Временная точка (день)	Гиперактивность	Бдительность	Двиг. сила и коорд	Осанка/дыхание	Тремор/судороги	Общий балл
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 A53T-РАС. Как показано на фиг. 7 и в таблице 9 (ниже), воздействия на мозг были приблизительно пропорциональными дозе и схожими во всех трех областях, включая полосатое тело. Зависимости воздействие ASO-005459-ответ для разных областей головного мозга показаны на фигурах 8А-8D. Аналогичные зависимости воздействие-ответ наблюдались в гиппокампе и стволе мозга с оценочными значениями  $IC_{50}$  179 нМ и 206 нМ, соответственно. Для сравнения, зависимость воздействие-ответ в полосатом теле была относительно крутой, что указывает на более медленную кинетику снижения уровня мРНК *SNCA* в этой области. См. фигуру 8С.

**Таблица 9: Сводные данные по воздействию на головной мозг ASO-005459 в 14-дневном исследовании A53T-РАС**

	Доза (мкг)	Среднее (нМ)	SD	Относительно гиппокампа
Гиппокамп	3,13	214	43	
	12,5	411	140	
	25	600	223	
	50	1916	807	
Ствол 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

**Таблица 9:** Сводные данные по воздействию на головной мозг ASO-005459 в 14-дневном исследовании A53T-РАС

Доза (мкг)	Среднее (нМ)	SD	Относительно гиппокампа
25	586	109	1,0
50	1332	302	0,7

Для получения более обширных данных по зависимости доза-ответ/время ASO-005459 снова вводили (0, 12,5, 25 или 50 мкг) непосредственно в желудочки головного мозга мышей A53T-РАС путем инъекции ICV методом «freehand». Животных умерщвляли через 24 часа, 3 дня, 4, 8, 12, 16 и 20 недель после дозирования и оценивали экспрессию мРНК *SNCA* в стволе мозга и полосатом теле.

Как показано на фигурах 9А и 9В (и в соответствии с данными, представленными выше), введение ASO-005459 мышам A53T-РАС привело к значительному снижению уровня экспрессии мРНК *SNCA* (относительно контролей, получавших носитель) как в стволе мозга, так и в полосатом теле. Снижение, по-видимому, зависит как от времени, так и от дозы, при этом пиковое снижение (~90%) наблюдалось в стволе мозга при 50 мкг ASO-005459 примерно через 4 недели после дозирования (фигура 9А). В полосатом теле пиковое снижение (~55%) наблюдалось при 50 мкг ASO-005459 примерно через 3 дня после дозирования (фигура 9В). Уровни экспрессии мРНК *SNCA* оставались значительно сниженными по сравнению с контролями, получавшими носитель, через 4 недели после дозирования (фигуры 10А и 10В) и возвращались к исходному уровню примерно через 16 недель после дозирования (фигуры 9А и 9В).

Как показано на фигурах 11А и 11В, введение ASO-005459 животным также привело к зависящему от времени и дозы снижению уровня белка SNCA в мозговой ткани как ствола мозга, так и полосатого тела. Пиковое снижение (~75%) наблюдалось в стволе головного мозга при дозе 50 мкг через 8 недель после дозирования (фигура 11А). Для мозговой ткани полосатого тела пиковое снижение (~75%) также наблюдалось при дозе 50 мкг, но через 4 недели после дозирования (фигура 11В). Уровни экспрессии для индивидуальных мышей через 8 недель после дозирования представлены на фигуре 12А (ствол мозга) и 12В (полосатое тело). Хотя уровень белка SNCA вернулся близко к исходному уровню примерно через 12 недель после





ASO-0054 59	8	24 ч	174	140	14 6		149					137			73	
	8	24 ч	129	108	13 8		133					145			90	
	8	3 дня	162	69	69		112					62			19	
	8	3 дня	127	67	72		114					87			31	
	2	2	133	140	10 9		161					104			21	
	2	2	117	127	10 0		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 снижения мРНК *SNCA*, описанного выше, яванских макак дозировали ASO-005459 (всего 8 мг на животное) и умерщвляли через 24 часа, 3 дня, 2, 4, 8, 13 или 20 недель после дозирования для оценки уровня экспрессии мРНК *SNCA* в различных тканях. Как показано на фигуре 13А, максимальное снижение наблюдалось в период между 2 неделями и 13 неделями после дозирования. Максимальные снижения на 70%, 65%, 75%, 35%, 94% и 99% наблюдались в мозговом веществе, мозжечке, варолиевом мосте, дорсальном стриатуме, лобном и поясничном отделах спинного мозга, соответственно. Это снижение уровня экспрессии мРНК *SNCA* также коррелирует с зависимым от времени снижением уровня экспрессии белка SNCA (фигура 13В).

Затем, чтобы оценить, зависело ли также снижение уровня экспрессии у яванских макак от дозы, животные получали 2, 4 или 8 мг ASO-005459 и затем были подвергнуты эвтаназии через 2 недели после дозирования. Как показано на фигурах 14А и 14В, снижение уровней экспрессии мРНК *SNCA* и белка SNCA также зависело от дозы, при этом наибольшее снижение наблюдалось при 8 мг ASO-005459.

Представленные в настоящем документе результаты демонстрируют, что ASO-005459 является сильным и селективным в отношении снижения мРНК *SNCA* и что ASO-005459 хорошо переносится в нейронах и в доклинических видах *in vivo*. Более того, результаты, полученные для нейронов A53T-РАС подтверждают, что ASO-005459-опосредованное снижение мРНК приводит к снижению уровней белка SNCA *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, результаты, полученные на мышях A53T-РАС и яванских макаках, демонстрируют, что ASO-005459 снижает уровень мРНК *SNCA* и белка SNCA в мозге при дозах, которые хорошо переносятся. В совокупности, эти результаты поддерживают продолжение разработки ASO-005459 в качестве модифицирующего заболевание терапевтического средства для лечения синуклеинопатий.

Эта заявка РСТ испрашивает приоритет предварительной заявки США 62/616937, поданной 12 января 2018 года, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

### Формула изобретения

1. Антисмысловой олигонуклеотид (ASO), содержащий, состоящий по существу или состоящий из непрерывной нуклеотидной последовательности AtTcctttacaccACAC (SEQ ID NO: 4), где заглавная буква представляет собой бета-D-окси-LNA, а строчная буква представляет собой ДНК.
2. ASO по п.1, который содержит межнуклеотидную связь, выбранную из группы, состоящей из фосфодиэфирной связи, фосфотриэфирной связи, метилфосонатной связи, фосфорамидатной связи, фосфоротиоатной связи и их комбинаций.
3. ASO по п.2, где межнуклеотидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь.
4. ASO по п.1, в котором непрерывная нуклеотидная последовательность представляет собой OxyAs DNAts OxyTs DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAas DNacs DNAas DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC, где OxyA, OxyT и Oxy MC представляют собой аденин бета-D-окси-LNA, тимин бета-D-окси-LNA и метилцитозин бета-D-окси-LNA, соответственно, где DNAt, DNac и DNAa представляют собой тимин ДНК, цитозин ДНК и аденин ДНК, соответственно, и где s представляет собой фосфоротиоатную связь между двумя нуклеотидами.
5. ASO по любому из пп.1-4, имеющий молекулярную формулу  $C_{171}H_{214}N_{56}O_{90}P_{16}S_{16}$  и структуру, показанную на фигуре 1B, где  $M^+$  представляет собой противоион.
6. ASO по п.5, где противоион выбран из группы, состоящей из  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$  и любой их комбинации.
7. ASO по п.6, где противоион представляет собой  $Na^+$ .
8. Конъюгат, содержащий ASO по любому из пп.1-7, где ASO ковалентно связан по меньшей мере с одним ненуклеотидным или неполинуклеотидным фрагментом.
9. Конъюгат по п.8, где ненуклеотидный или неполинуклеотидный фрагмент содержит белок, цепь жирной кислоты, остаток сахара, гликопротеин, полимер или любые их комбинации.

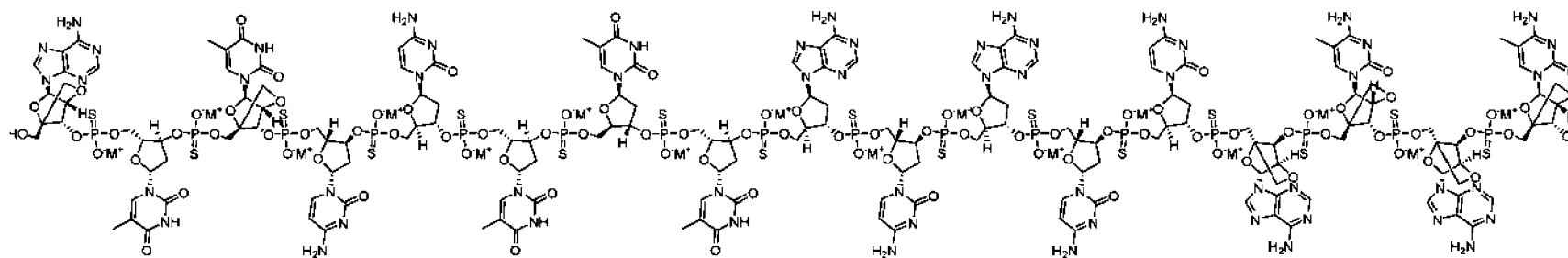
10. Фармацевтическая композиция, содержащая ASO по любому из пп.1-7 или конъюгат по п.8 или 9 и фармацевтически приемлемый носитель.
11. Композиция по п.10, которая дополнительно содержит терапевтический агент.
12. Композиция по п.11, где терапевтическое средство представляет собой антагонист альфа-синуклеина.
13. Набор, содержащий ASO по любому из пп.1-7, конъюгат по п.8 или 9 или композиция по любому из пп.10-12 и инструкции по применению.
14. Диагностический набор, содержащий ASO по любому из пп.1-7, конъюгат по п.8 или 9 или композицию по любому из пп.10-12 и инструкции по применению.
15. Способ ингибирования или снижения экспрессии белка SNCA в клетке, при этом способ включает введение ASO по любому из пп.1-7, конъюгата по п.8 или 9, или композиции по любому из пп.10-12 в клетку, экспрессирующую белок SNCA, причем экспрессия белка SNCA в клетке ингибируется или уменьшается после введения.
16. Способ по п.15, в котором ASO ингибирует или снижает экспрессию мРНК SNCA в клетке после введения.
17. Способ по п.15 или 16, в котором экспрессия мРНК SNCA снижается по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90% или примерно на 100% после введения по сравнению с клеткой, не подвергшейся воздействию ASO.
18. Способ по любому из пп.15-17, в котором ASO снижает экспрессию белка SNCA в клетке после введения по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80% или по меньшей мере примерно на 90% по сравнению с клеткой, не подвергшейся воздействию ASO.

19. Способ по любому из пп.15-18, в котором клетка представляет собой нейрон.
20. Способ лечения синуклеинопатии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества ASO по любому из пп.1-7, конъюгата по п.8 или 9 или композиции по любому из пп.10-12 субъекту.
21. Применение ASO по любому из пп.1-7, конъюгата по п.8 или 9 или композиции по любому из пп.10-12 для изготовления лекарственного средства.
22. Применение ASO по любому из пп.1-7, конъюгата по п.8 или 9 или композиции по любому из пп.10-12 для изготовления лекарственного средства для лечения синуклеинопатии у субъекта, нуждающегося в этом.
23. ASO по любому из пп.1-7, конъюгат по п.8 или 9 или композиция по любому из пп.10-12 для применения в терапии.
24. ASO по любому из пп.1-7, конъюгат по п.8 или 9 или композиция по любому из пп.10-12 для применения в терапии синуклеинопатии у субъекта, нуждающегося в этом.
25. Способ по п.20, применение по п.21 или 22 или ASO для применения по п.23 или 24, где синуклеинопатия выбрана из группы, состоящей из болезни Паркинсона, деменции при болезни Паркинсона (PDD), множественной системной атрофии, деменции с тельцами Леви и любые их комбинации.
26. Способ по п.20 или 25, применение по любому из пп.21, 22 и 25 или ASO для применения по любому из пп.23-25, в котором субъект является человеком.
27. Способ по любому из пп.20, 25 и 26, применение по любому из пп.21, 22, 25 и 26 или ASO для применения по любому из пп.23-26, в котором ASO, конъюгат или композицию вводят перорально, парентерально, интратекально, интрацеребровентрикулярно, легочно, местно или интравентрикулярно.

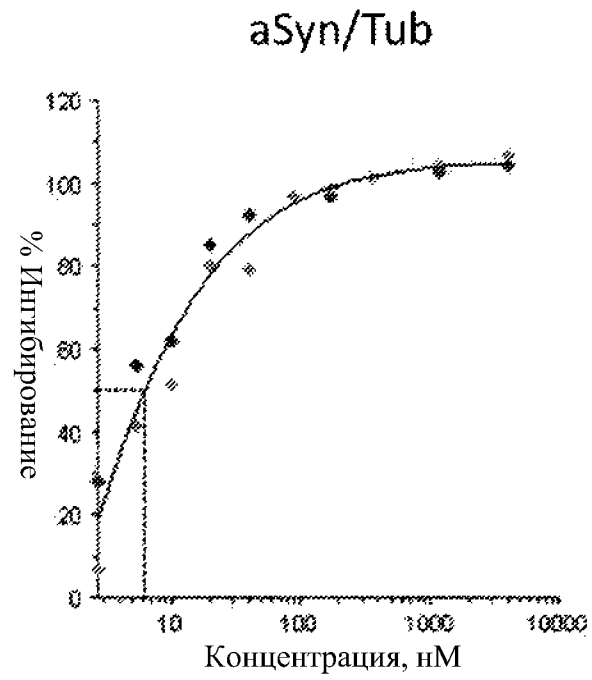
**ФИГ. 1А. ASO-005459**

OxyAs DNAts OxyTs DNacs DNacs DNAts DNAts DNAts DNAts DNAs DNacs DNAs DNacs DNacs OxyAs OxyMCs OxyAs OxyMC

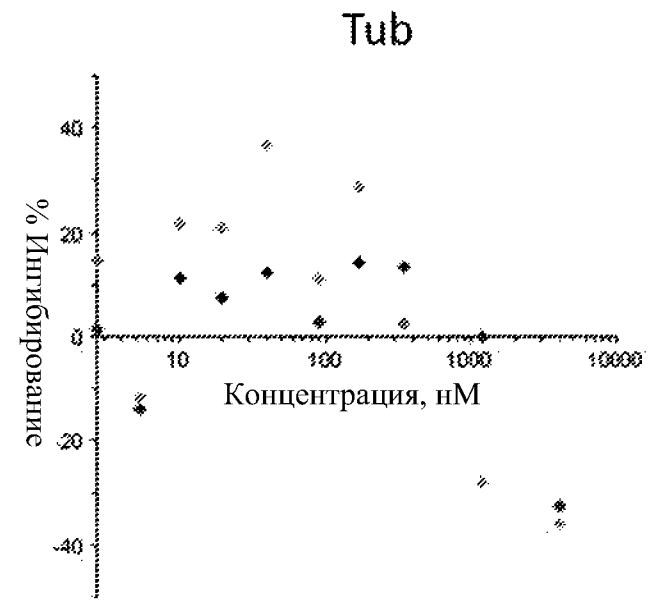
**ФИГ. 1В**



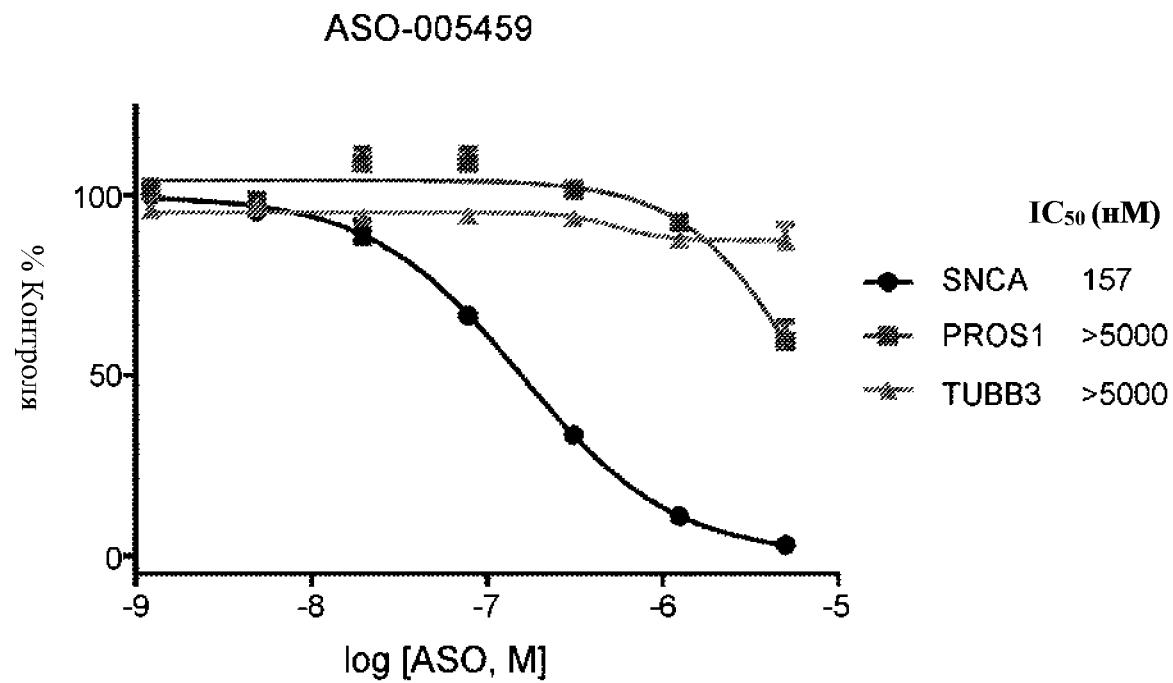
ФИГ. 2А



ФИГ. 2В



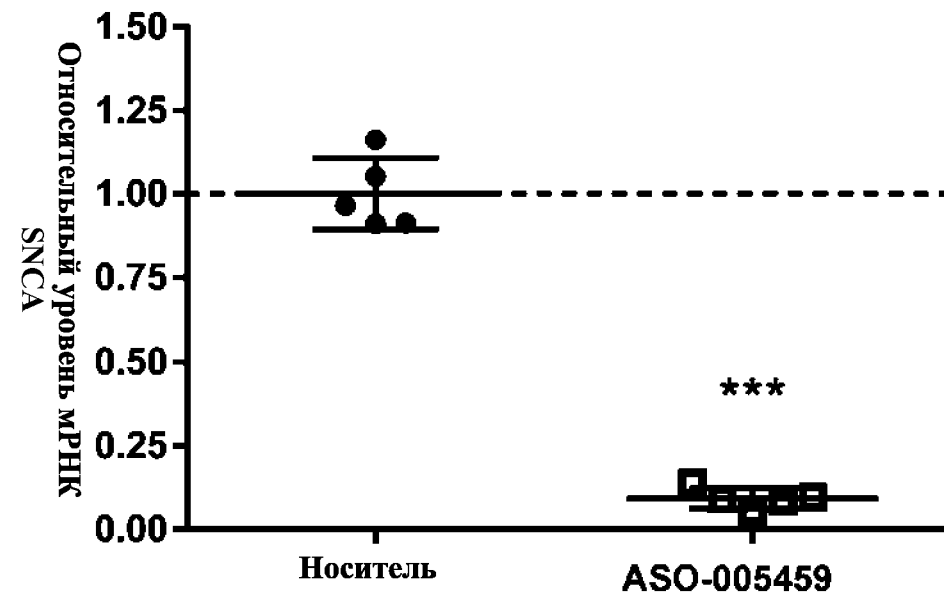
ФИГ. 3





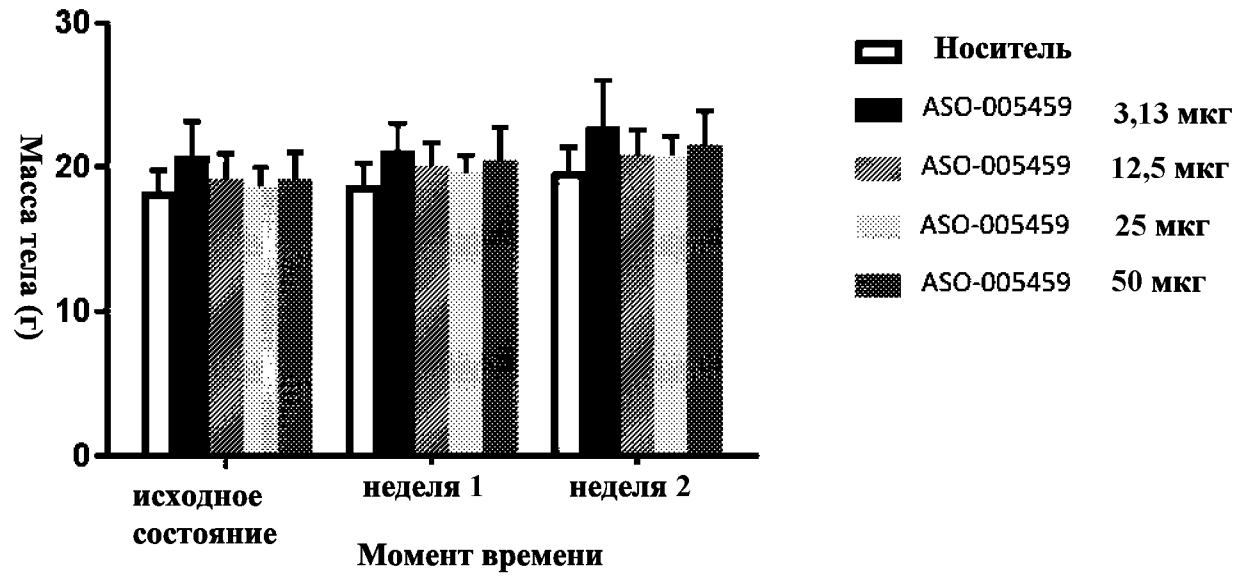
ФИГ. 4

3-Дневное исследование  
переносимости в гиппокампе



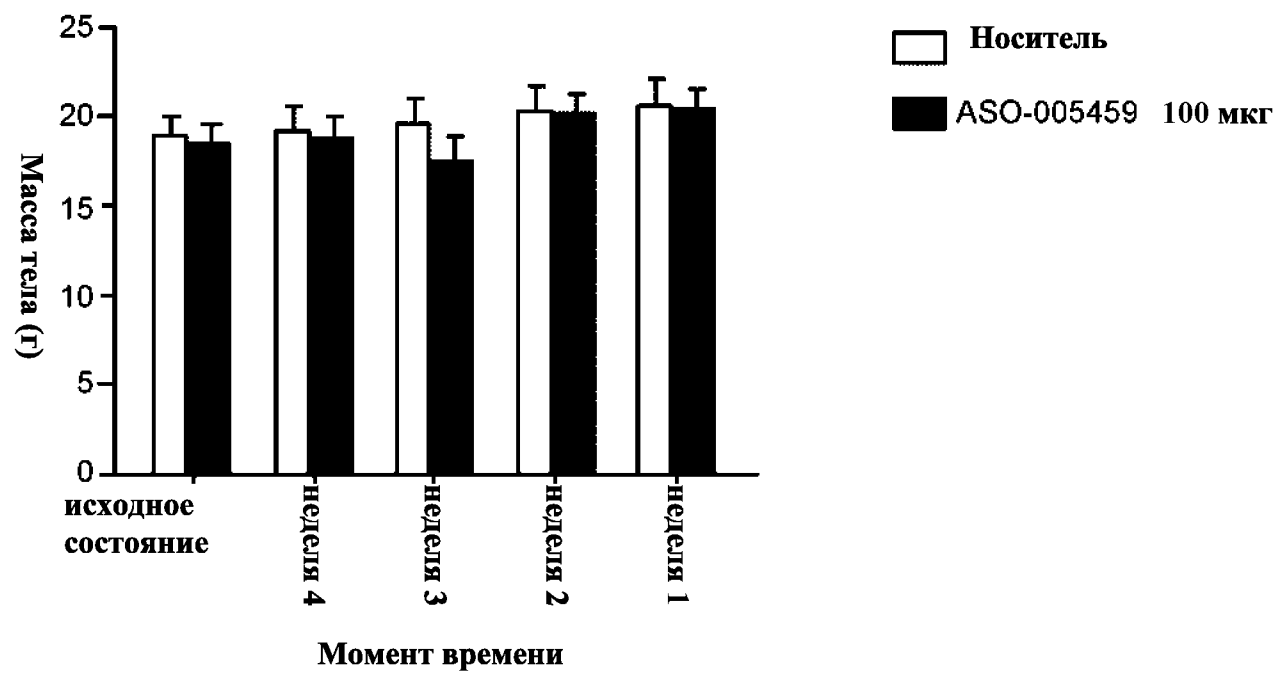
ФИГ. 5А

14-Дневное исследование зависимости  
эффекта от дозы  
Масса тела

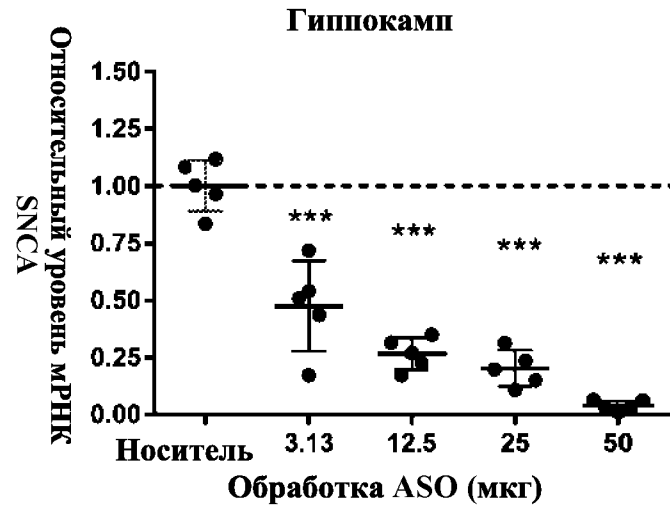


**ФИГ. 5В**

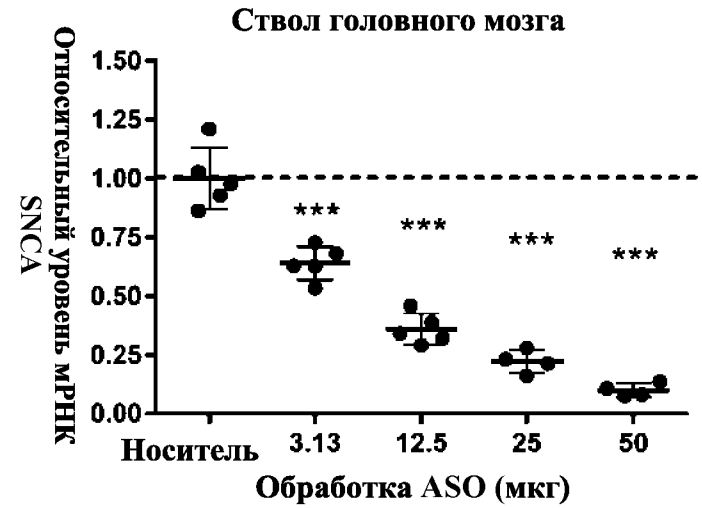
**28-Дневное исследование  
Масса тела**



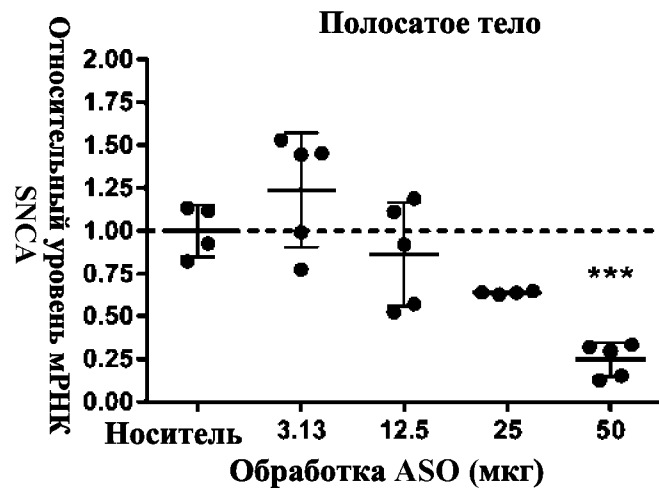
ФИГ. 6А



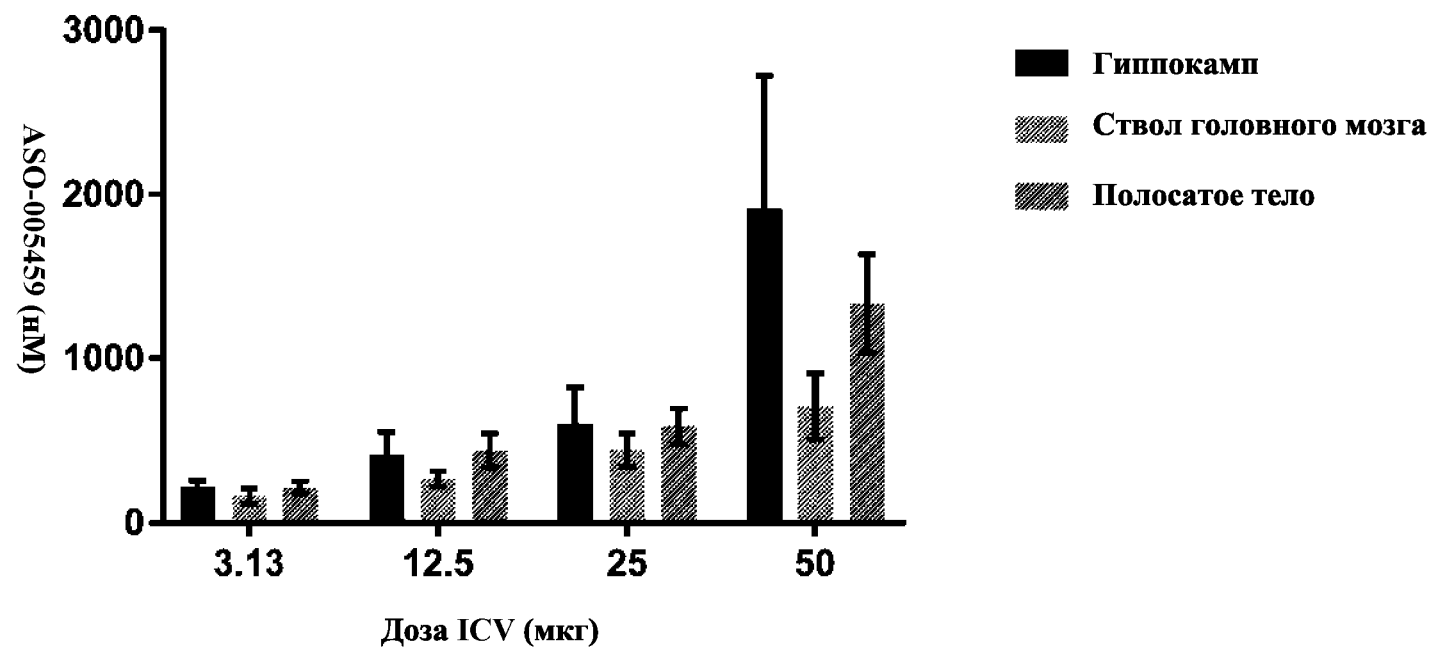
ФИГ. 6В



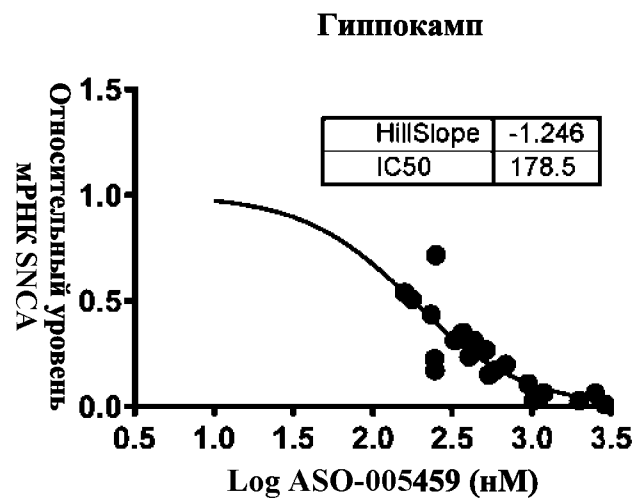
ФИГ. 6А



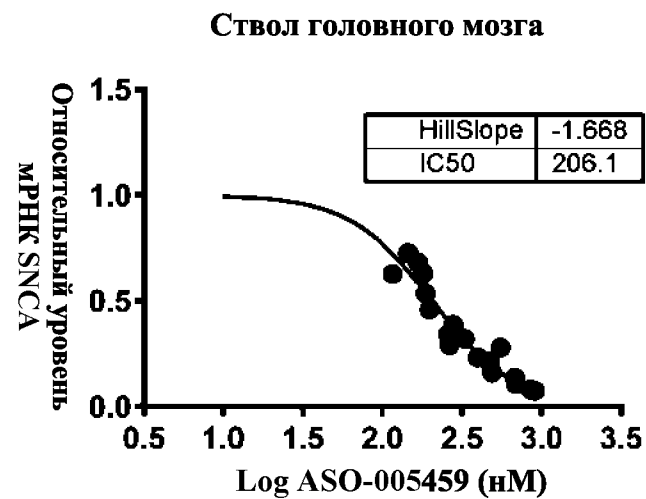
ФИГ. 7



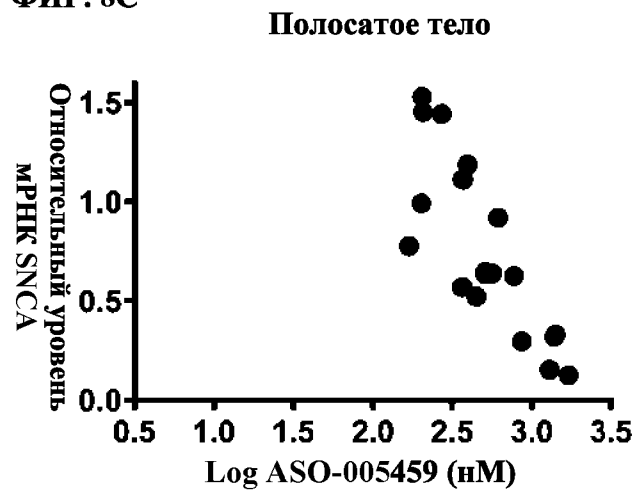
ФИГ. 8А



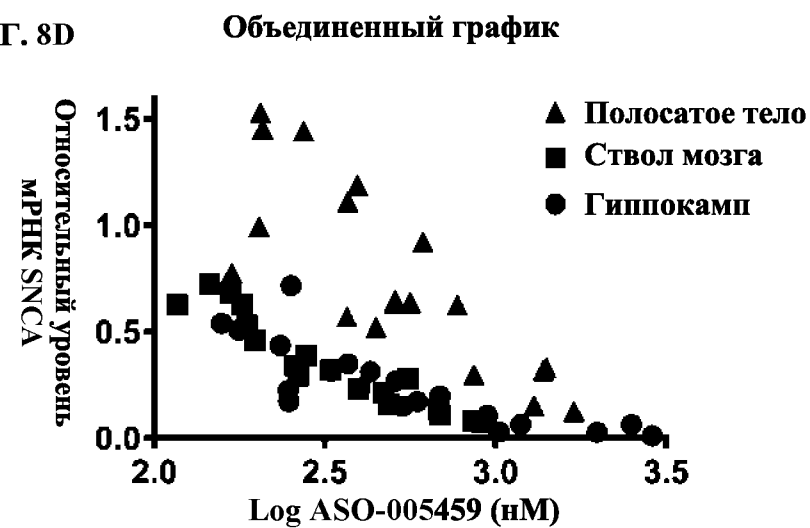
ФИГ. 8В



ФИГ. 8С

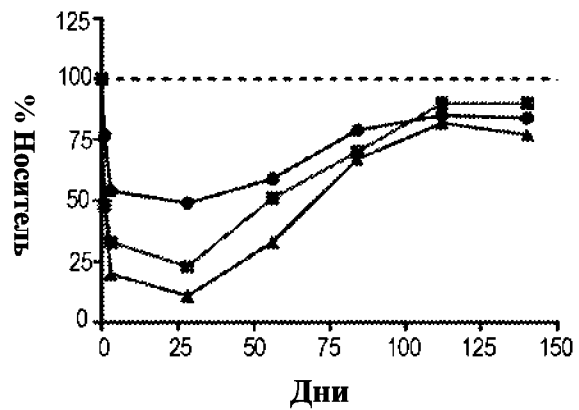


ФИГ. 8D



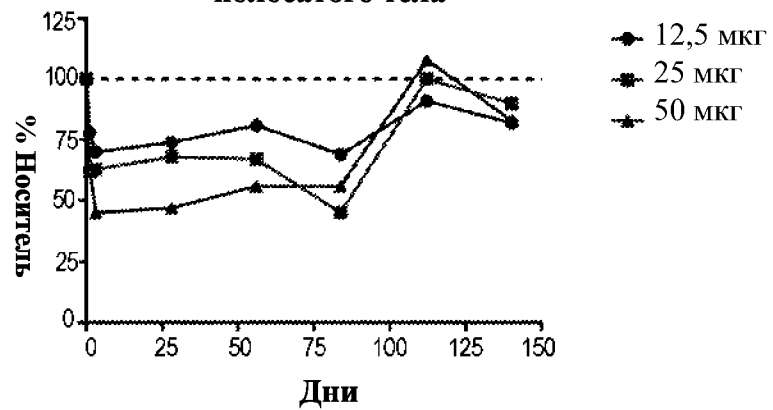
**ФИГ. 9А**

**Снижение мРНК  
Сводные данные для  
ствола головного мозга**



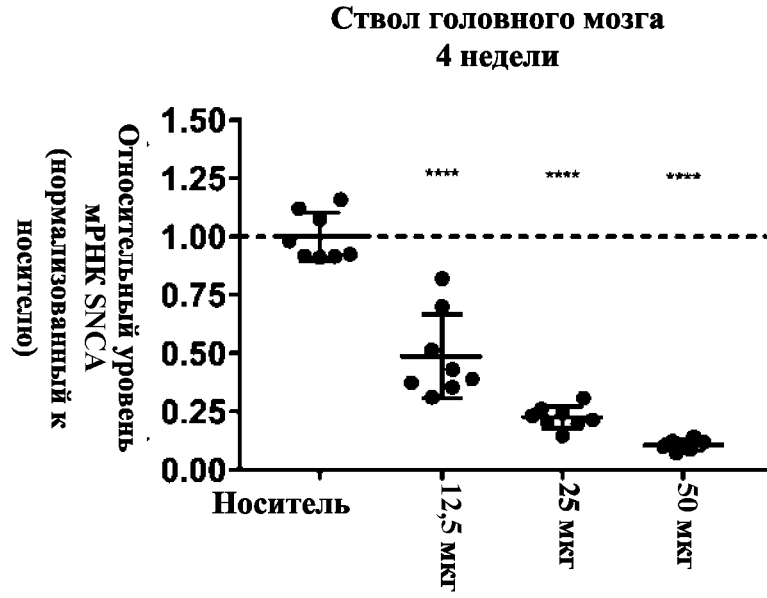
**ФИГ. 9В**

**Снижение мРНК  
Сводные данные для  
полосатого тела**

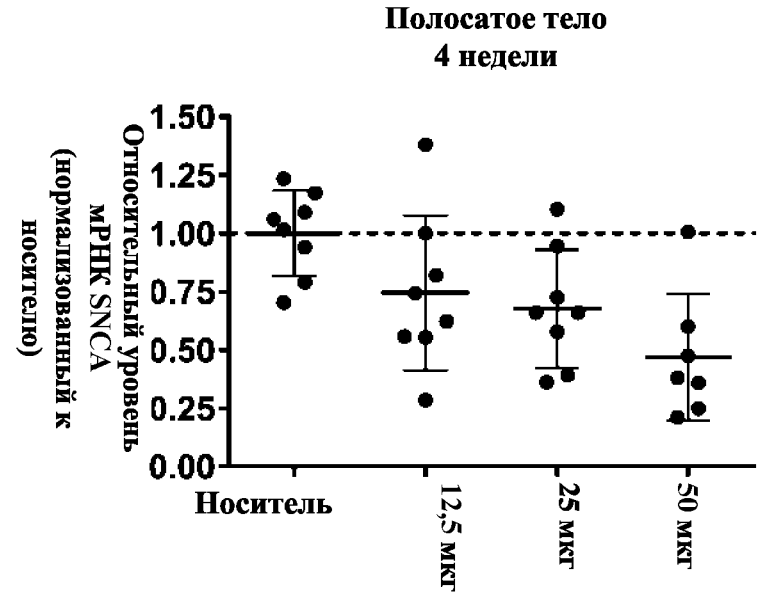


**ФИГ. 9В**

ФИГ. 10А



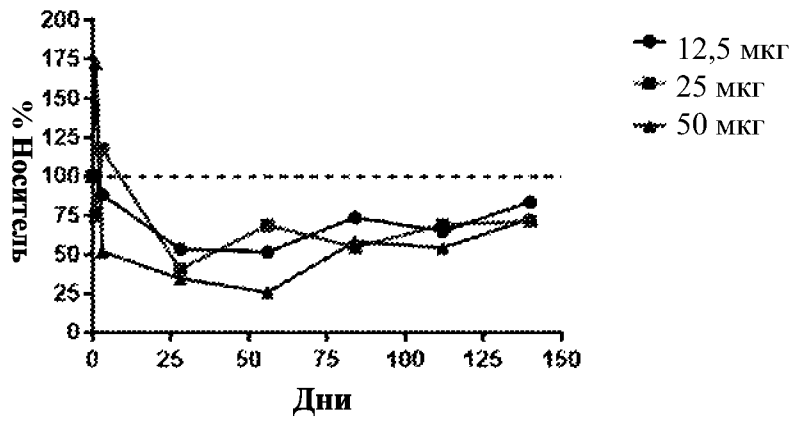
ФИГ. 10В





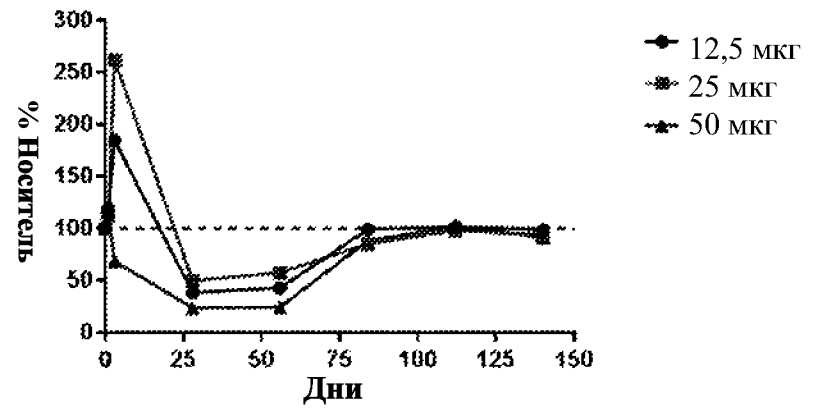
ФИГ. 11А

Снижение уровня белка aSyn  
Сводные данные для ствола  
головного мозга



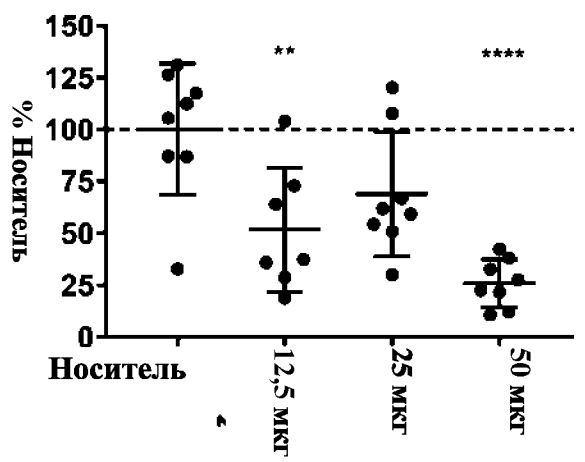
ФИГ. 11В

Снижение уровня белка aSyn  
Сводные данные для  
полосатого тела



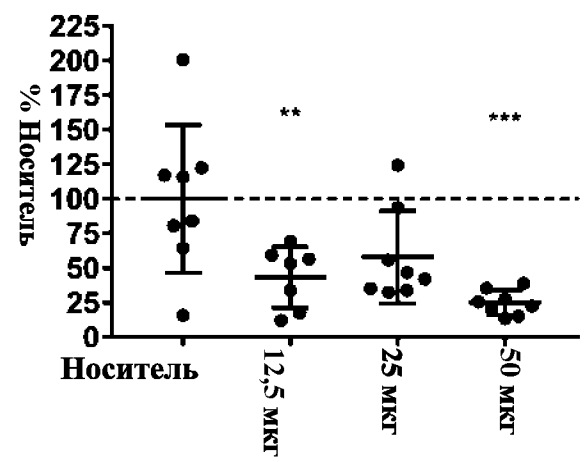
ФИГ. 12А

Ствол головного мозга  
8 недель

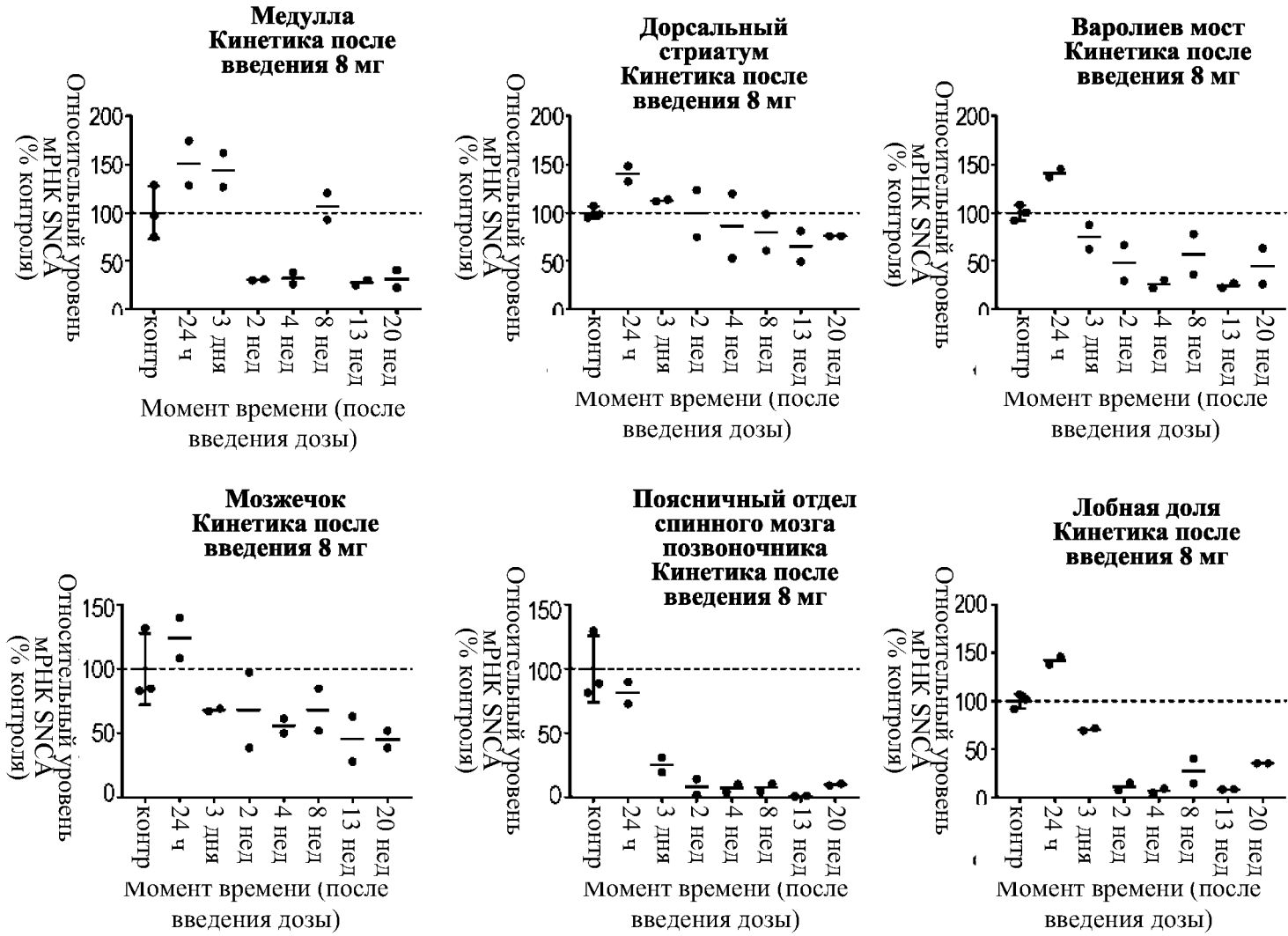


ФИГ. 12В

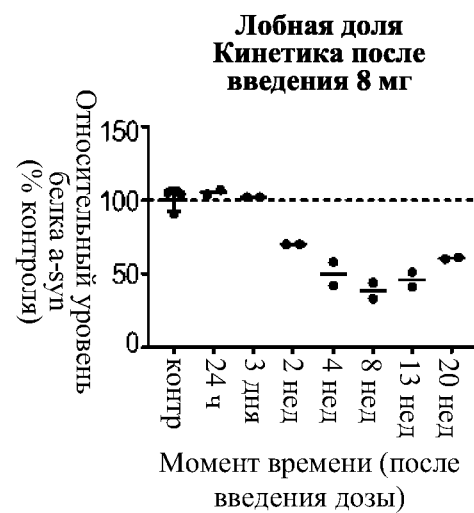
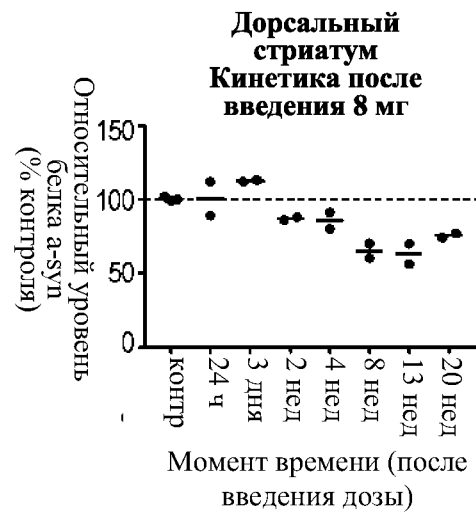
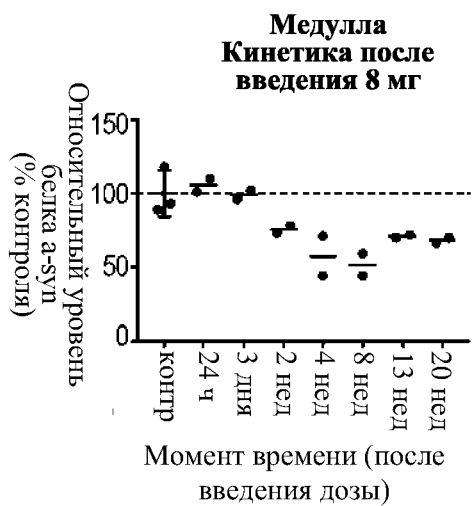
Полосатое тело  
8 недель



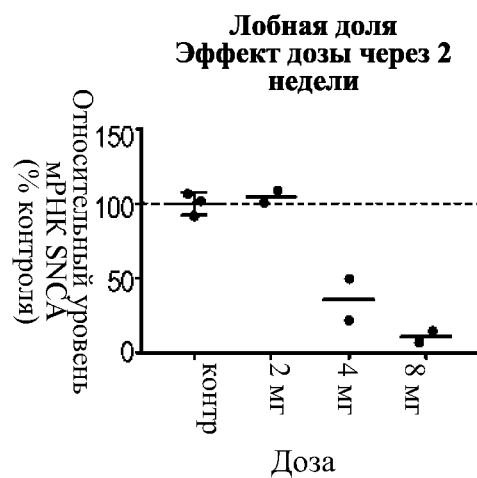
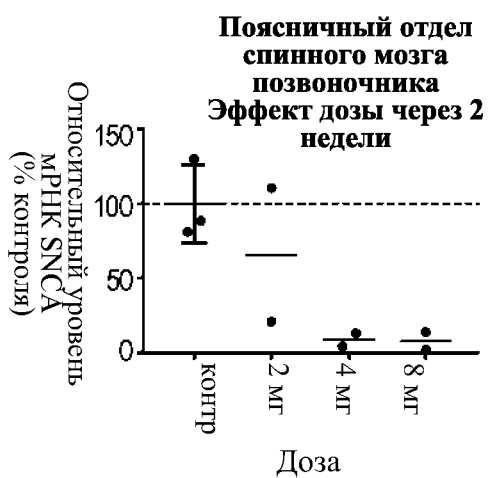
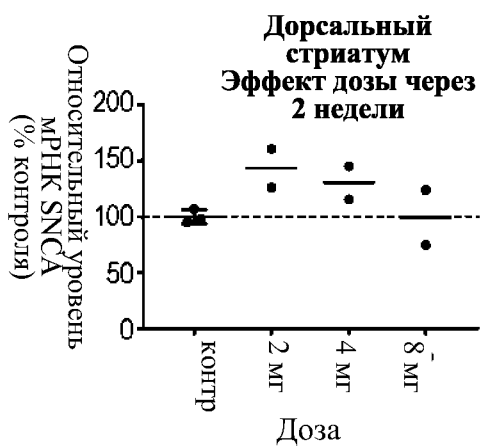
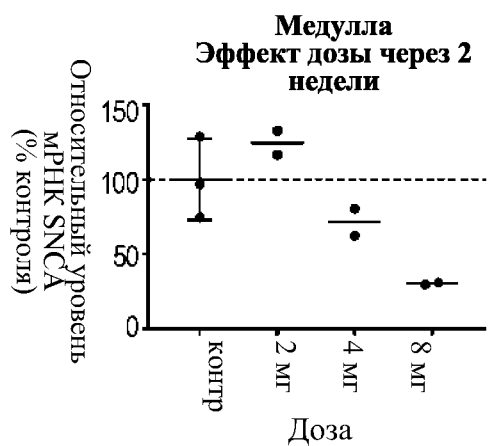
**ФИГ. 13А**



**ФИГ. 13В**



**ФИГ. 14А**



**ФИГ. 14В**

