

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 036417

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2020.11.09

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

(21) Номер заявки

201891468

(22) Дата подачи заявки

2016.12.19

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ TAU

(31) 62/270,165

(56) WO-A2-2015010135

(32) 2015.12.21

WO-A1-2013148283

(33) US

(43) 2018.12.28

(86) PCT/IB2016/057794

(87) WO 2017/109679 2017.06.29

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:

Полидоро Офенгейм Мануэла, Вайлер
Ян (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к композициям и к способам для снижения уровня экспрессии мРНК и белка tau. Эти композиции и способы могут быть применены для лечения tau-ассоциированных заболеваний и расстройств.

036417
B1

B1
—

036417
—

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В данной заявке испрашивается преимущество предварительной заявки США № 62/270165, поданной 21 декабря 2015 г., которая во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к композициям и к способам для снижения уровня экспрессии мРНК и белка tau. Эти композиции и способы могут быть применены для лечения tau-ассоциированных заболеваний.

Предшествующий уровень техники

Tau представляет собой ассоциированный с микротрубочками белок, который стабилизирует микротрубочки и облегчает транспорт аксонов. Белок Tau взаимодействует с тубулином и стабилизирует микротрубочки, что способствует сборке тубулина в микротрубочки. Сеть микротрубочек участвует во многих важных клеточных процессах, включая формирование цитоскелета и сохранение структуры и морфологии клетки, а также обеспечение платформы для внутриклеточного транспорта везикул, органелл и макромолекул. Поскольку связывание tau с микротрубочками стабилизирует микротрубочки, то tau является ключевым медиатором этих клеточных процессов.

В человеческом мозге присутствуют по меньшей мере шесть изоформ tau длиной в пределах от 352 до 441 аминокислотных остатков. Изоформы tau происходят от одного гена MAPT (белка tau, ассоциированного с микротрубочками), расположенного на хромосоме 17. Транскрипт MAPT подвергается комплексному, регулируемому альтернативному сплайсингу, что приводит к образованию множества видов мРНК. Экзоны 2 и 3 MAPT кодируют последовательность в 29- или 58- аминокислот соответственно, и, таким образом, альтернативный сплайсинг экзонов 2 и/или 3 приводит к включению 0, 1 или 2 копий N-концевого домена из 29 кислотных аминокислот, которые обозначаются как 0N, 1N или 2N tau соответственно. Экзон 10 MAPT кодирует домен, связывающийся с микротрубочками, и, таким образом, включение экзона 10 обеспечивает присутствие дополнительного домена, связывающегося с микротрубочками. Поскольку в tau присутствуют три домена, связывающихся с микротрубочками, то изоформы tau, которые включают экзон 10, обозначаются "4R tau", что означает, что белок tau имеет четыре повторяющихся домена, связывающихся с микротрубочками. Изоформы tau без экзона 10 обозначаются "3R tau", а это означает, что белок tau имеет три повторяющихся домена, связывающихся с микротрубочками. Изоформы 4R tau, предположительно, связываются с микротрубочками лучше, чем изоформы 3R tau, поскольку они имеют еще один домен, связывающийся с микротрубочками. Отношение 3R tau к 4R tau регулируется в процессе развития, причем в тканях плода экспрессируются исключительно 3R tau, а в тканях взрослого человека экспрессируются 3R tau и 4R tau приблизительно на одинаковых уровнях.

Tau представляет собой фосфопротеин, имеющий приблизительно 85 потенциальных сайтов фосфорилирования (Ser, Thr или Tyr) на самой длинной изоформе Tau (Pedersen and Sigurdsson, Trends in Molecular Medicine 2015, 21 (6): 394). Сообщалось, что фосфорилированию подвергается приблизительно половина этих сайтов в нормальных белках tau. Tau динамически фосфорилируется и дефосфорилируется во время клеточного цикла. Tau может связываться только с микротрубочками в его дефосфорилированной форме, и, таким образом, фосфорилирование tau действует в качестве прямого переключателя ассоциации-диссоциации микротрубочек в нейроне. В патологических условиях белок tau становится гиперфосфорилированным, что приводит к потере связывания с тубулином и к дестабилизации микротрубочек, с последующий агрегацией и осаждением tau в патогенных нейрофибрillaryных клубках. Фрагменты расщепления tau протеазой (Asp13, Glu391 и Asp421) также были идентифицированы в нейрофибрillaryных клубках.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении описаны антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на человеческий белок tau, ассоциированный с микротрубочками (MAPT); композиции, содержащие эти антисмыловые олигонуклеотиды, и способы снижения уровня экспрессии мРНК и белка tau с использованием этих антисмыловых олигонуклеотидов. Описанные здесь способы и композиции являются подходящими для лечения tau-ассоциированных заболеваний.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к олигонуклеотидам, содержащим последовательность нуклеотидных оснований, которая по меньшей мере на 70% (например, на 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%) идентична любым последовательностям нуклеотидных оснований, представленным в табл. 2-17, где С в любых последовательностях нуклеотидных оснований представляет собой либо цитозин, либо 5-метилцитозин, и где по меньшей мере один нуклеотид этого олигонуклеотида имеет 2'-модификацию. Эти олигонуклеотиды представляют собой антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на человеческий MAPT. 2'-модификация может быть выбрана из группы, состоящей из 2'-фтора, 2'-дезокси-2'-фтора, 2'-O-метила, 2'-O-метоксиэтила (2'-O-MOE), 2'-O-аминопропила (2'-O-AP), 2'-O-диметиламиноэтила (2'-O-DMAOE), 2'-O-диметиламино-пропила (2'-O-DMAP), 2'-O-диметиламиноэтоксиэтила (2'-O-DMAEAE) и 2'-O-N-метилацетамидо (2'-O-NMA). В некоторых вариантах осуществления изобретения 2'-модификацией является 2'-O-метоксиэтил (2'-O-MOE). В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый С в любых после-

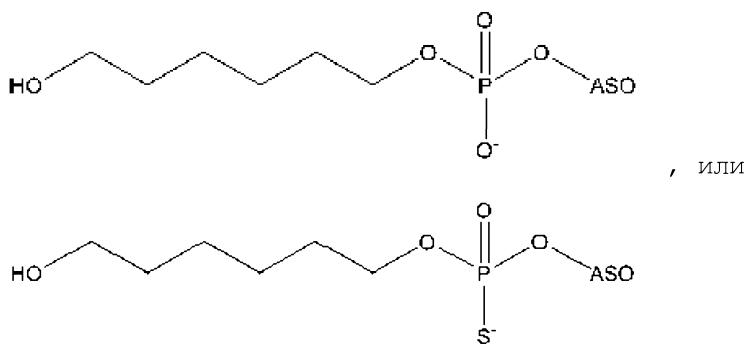
довательностях нуклеотидных оснований представляет собой 5-метилцитозин.

В некоторых вариантах осуществления изобретения представленные здесь антисмыловые олиго-нуклеотиды имеют длину от 12 до 30 нуклеотидных оснований. Так, например, антисмыловой олиго-нуклеотид, нацеленный на МАРТ, может включать 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидных оснований. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, имеют длину от 12 до 25 нуклеотидных оснований. Так, например, антисмыловой олигонуклеотид, нацеленный на МАРТ, может включать 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидных оснований. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, имеют длину от 15 до 20 нуклеотидных оснований. Так, например, антисмыловой олигонуклеотид, нацеленный на МАРТ, может включать 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидных оснований.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, представляют собой стерические блокаторы. Такие антисмыловые олиго-нуклеотиды снижают уровень экспрессии мРНК и/или белка tau независимо от РНКазы Н. Межнуклеозидными связями стерических блокаторов могут быть фосфодиэфирные или фосфортиоатные связи. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, представляют собой стерические блокаторы, содержащие последовательность нуклеотидных оснований, которая по меньшей мере на 70% (например, на 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%) идентична любым последовательностям нуклеотидных оснований, представленным в табл. 2-8, где С в любых последовательностях нуклеотидных оснований представляют собой либо цитозин, либо 5-метилцитозин, и где каждый нуклеотид этого олигонуклеотида имеет 2'-модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловой олигонуклеотид, нацеленный на МАРТ, содержит последовательность нуклеотидных оснований, которая по меньшей мере на 80% идентична любым последовательностям, представленным в табл. 2-8. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловой олигонуклеотид, нацеленный на МАРТ, содержит последовательность нуклеотидных оснований, которая по меньшей мере на 90% идентична любым последовательностям, представленным в табл. 2-8. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловой олигонуклеотид, нацеленный на МАРТ, содержит любые последовательности нуклеотидных оснований, представленные в табл. 2-8. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловой олигонуклеотид, нацеленный на МАРТ, состоит из любых последовательностей нуклеотидных оснований, представленных в табл. 2-8. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый С в любых последовательностях нуклеотидных оснований представляет собой 5-метилцитозин.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловой олигонуклеотид, нацеленный на МАРТ, имеет 2'-O-MOE-модификацию в каждой нуклеотидной субъединице.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловой олигонуклеотид, нацеленный на МАРТ, содержит линкер, присоединенный к 3'-концу олигонуклеотида посредством фосфатного мостика, и этот олигонуклеотид имеет любую из следующих структур:



В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, представляют собой гапмеры, которые имеют центральный гэп-сегмент из смежных 2'-дезоксирибонуклеотидов, расположенных между двумя сегментами крыла у 5'- и 3'-концов (также называемых 5'-крылом и 3'-крылом соответственно). Такие антисмыловые олигонуклеотиды снижают уровень экспрессии мРНК и/или белка tau посредством активирующей РНКазы Н. Межнуклеозидной связью гапмеров могут быть фосфортиоатные или фосфодиэфирные связи. В некоторых вариантах осуществления изобретения гапмеры содержат фрагмент по меньшей мере из пяти (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) смежных 2'-дезоксирибонуклеотидов, а сегменты 5'- и 3'-крыльев содержат один или более 2'-модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения такой олигонуклеотид содержит по меньшей мере семь (например, 7, 8, 9, 10, 11, 12) смежных 2'-дезоксирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения такой олигонуклеотид содержит десять смежных 2'-дезоксирибонуклеотидов. 2'-Модификация может быть выбрана из группы, состоящей из 2'-фтора, 2'-дезокси-2'-фтора, 2'-O-метила, 2'-O-метоксиэтила (2'-O-MOE), 2'-O-

аминопропила (2'-O-AP), 2'-O-диметиламиноэтила (2'-O-DMAOE), 2'-O-диметиламинопропила (2'-O-DMAP), 2'-O-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-O-DMAEOE) и 2'-O-N-метилацетамида (2'-O-NMA). В некоторых вариантах осуществления изобретения гапмеры содержат 2'-O-MOE-модифицированный нуклеотид в 5'-крыле и 3'-крыле.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гапмеры, нацеленные на tau, представляют собой 5-10-5-гапмеры, которые имеют длину в 20 нуклеозидов, где центральный гэп-сегмент содержит десять смежных 2'-дезоксинуклеозидов, фланкированных 5'-крылом и 3'-крылом, где каждое крыло включает пять нуклеозидов, каждый из которых имеет 2'-O-MOE-модификацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, представляют собой гапмеры, содержащие последовательность нуклеотидных оснований, которая по меньшей мере на 70% (например, на 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%) идентична любым последовательностям, представленным в табл. 9-15 и 17, где С в любых последовательностях нуклеотидных оснований представляет собой либо цитозин, либо 5-метилцитозин, и где по меньшей мере один нуклеотид этого олигонуклеотида имеет 2'-модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловой олигонуклеотид, нацеленный на МАРТ, содержит последовательность нуклеотидных оснований, которая по меньшей мере на 80% идентична любым последовательностям, представленным в табл. 9-15 и 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловой олигонуклеотид, нацеленный на МАРТ, содержит последовательность нуклеотидных оснований, которая по меньшей мере на 90% идентична любым последовательностям нуклеотидных оснований, представленным в табл. 9-15 и 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловой олигонуклеотид, нацеленный на МАРТ, содержит любые последовательности нуклеотидных оснований, представленные в табл. 9-15 и 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловой олигонуклеотид, нацеленный на МАРТ, состоит из любых последовательностей нуклеотидных оснований, представленных в табл. 9-15 и 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, представляют собой 5-10-5-гапмеры, которые содержат любые последовательности нуклеотидных оснований, представленные в табл. 9-15 и 17, где каждый из 1-5 нуклеотидов содержит 2'-O-MOE-модифицированный нуклеозид; каждый из 6-15 нуклеотидов содержит 2'-дезоксинуклеозид; а каждый из 16-20 нуклеотидов содержит 2'-O-MOE-модифицированный нуклеозид. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый С в любых последовательностях нуклеотидных оснований представляет собой 5-метилцитозин.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловой олигонуклеотид, нацеленный на МАРТ, содержит последовательность нуклеотидных оснований, выбранную из любых SEQ ID NO: 208, 284, 285, 313, 329, 335, 366, 384, 386, 405, 473 и 474. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловой олигонуклеотид, нацеленный на МАРТ, содержит последовательность нуклеотидных оснований, которая по меньшей мере на 90% (например, на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%) идентична последовательности SEQ ID NO: 284. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловой олигонуклеотид, нацеленный на МАРТ, содержит SEQ ID NO: 284. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловой олигонуклеотид, нацеленный на МАРТ, содержит последовательность нуклеотидных оснований, которая по меньшей мере на 90% (например, на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%) идентична последовательности SEQ ID NO: 285 или 208. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловой олигонуклеотид, нацеленный на МАРТ, содержит SEQ ID NO: 285 или 208.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к олигонуклеотидам, содержащим последовательность нуклеотидных оснований, которая комплементарна по меньшей мере 12 смежным нуклеотидным основаниям любой из SEQ ID NO: 487-506 с 1, 2 или 3 несоответствиями, где по меньшей мере один нуклеотид этого олигонуклеотида имеет 2'-модификацию. Эти олигонуклеотиды представляют собой антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ. В некоторых вариантах осуществления изобретения такой олигонуклеотид содержит последовательность нуклеотидных оснований, которая на 100% комплементарна по меньшей мере 12 смежным нуклеотидным основаниям любой из SEQ ID NO: 487-506. В некоторых вариантах осуществления изобретения такой олигонуклеотид содержит один или более 5-метилцитозинов. В некоторых вариантах осуществления изобретения такой олигонуклеотид имеет 2'-модификацию. 2'-Модификация может быть выбрана из группы, состоящей из 2'-фтора, 2'-дезокси-2'-фтора, 2'-O-метила, 2'-O-метоксиэтила (2'-O-MOE), 2'-O-аминопропила (2'-O-AP), 2'-O-диметиламиноэтила (2'-O-DMAOE), 2'-O-диметиламинопропила (2'-O-DMAP), 2'-O-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-O-DMAEOE) и 2'-O-N-метилацетамида (2'-O-NMA). В некоторых вариантах осуществления изобретения 2'-модификацией является 2'-O-метоксиэтил (2'-O-MOE). В некоторых вариантах осуществления изобретения такой олигонуклеотид содержит по меньшей мере пять (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) смежных 2'-дезоксирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения такой олигонуклеотид содержит по меньшей мере семь (например, 7, 8, 9, 10, 11, 12) смежных 2'-дезоксирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления такой олигонуклеотид содержит десять смежных 2'-дезоксирибонуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, способны снижать уровень экспрессии мРНК или белка tau по меньшей мере на 30% *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, способны снижать уровень экспрессии мРНК или белка tau по меньшей мере на 30% *in vivo*.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к композициям, содержащим любые описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способам снижения уровня экспрессии tau у индивидуума, например у индивидуума, страдающего tau-ассоциированным заболеванием или восприимчивого к такому заболеванию, путем введения этому индивидууму терапевтически эффективного количества любого описанного здесь антисмылового олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения такие способы могут включать введение второго агента индивидууму. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловой олигонуклеотид, нацеленный на МАРТ, может быть введен индивидууму интратекально, интракраниально, интраназально, перорально, внутривенно или подкожно. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуумом является человек.

Настоящее изобретение относится к описанным здесь антисмыловым олигонуклеотидам для их применения в целях лечения tau-ассоциированного заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом, например у индивидуума, страдающего tau-ассоциированным заболеванием или восприимчивого к такому заболеванию. Также рассматривается применение описанных здесь антисмыловых олигонуклеотидов или фармацевтической композиции для лечения tau-ассоциированного заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом. Настоящее изобретение также включает применение описанных здесь антисмыловых олигонуклеотидов в целях приготовления лекарственного препарата для применения в лечении tau-ассоциированного заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом.

Tau-ассоциированное заболевание может быть выбрано из болезни Альцгеймера (БА), амиотрофического бокового склероза/комплекса паркинсонизм-деменция (АБС-КПД), деменции в области аргирофильных зерен (ДАГЗ), амилоидной ангиопатии британского типа, церебральной амилоидной ангиопатии, хронической травматической энцефалопатии (ХТЭ), кортико базальной дегенерации (КБД), болезни Крейцфельда-Якоба (БКЯ), деменции боксеров, диффузных повреждений нейрофибрillaryных клубков с кальцификацией, синдрома Дауна, синдрома Дравета, эпилепсии, деменции в области лобно-височной доли (ДЛВД), деменции в области лобно-височной доли, ассоциированной с паркинсонизмом, скрепленным с хромосомой 17 (FTDP-17), дегенерации передней лобно-височной доли, ганглиоглиомы, ганглионитомы, болезни Герстманна-Штраусслера-Шейнкера, болезни Галервортена-Шпатца, болезни Гентингтона, миозита, вызываемого тельцами включения, энцефалопатии, вызываемой свинцом, болезни Литико-Бодига, менингиоангиоматоза, атрофии многих органов, миотонической дистрофии, болезни Нимана-Пика типа С (НП-С), негваманиевомого заболевания двигательных нейронов, ассоциированного с поражением нейрофибрillaryных клубков, болезни Пика (БП), постэнцефалитного паркинсонизма, церебральной амилоидной ангиопатии, вызываемой белками прионами, прогрессирующего субкортикального глиоза, прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП), подострого склерозирующего панэнцефалита, деменции, поражающей только область клубков, деменции, преобладающей в области клубков, мультиинфарктной деменции, ишемического инсульта или клубневого склероза.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1А-1Е показана физическая характеристика антисмылового олигонуклеотида, нацеленного на МАРТ. На фиг. 1А показана структура антисмылового олигонуклеотида (ASO), содержащего SEQ ID NO: 284 и имеющего формулу $C_{230}H_{321}N_{72}O_{120}P_{19}S_{19}$ с предполагаемой молекулярной массой 7212,3 Да. На фиг. 1В представлены данные, полученные с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС) для ASO, содержащего SEQ ID NO: 284, с измеренной массой пика 7214,3. На фиг. 1С представлены данные пика обратной свертки в ЖХ-МС для ASO, содержащего SEQ ID NO: 284. На фиг. 1Д представлены данные ЖХ-МС для ASO, содержащего SEQ ID NO: 285, с измеренной массой пика 7232,5. На фиг. 1Е представлены данные пика обратной свертки в ЖХ-МС для ASO, содержащего SEQ ID NO: 285.

На фиг. 2А-2Е показан уровень экспрессии мРНК и белка человеческого tau у репрезентативных hTau-трансгенных мышей ВАС до и после их обработки антисмыловым олигонуклеотидом. На фиг. 2А представлены репрезентативные результаты ОТ-ПЦР, которые показали, что все шесть транскриптов человеческого tau присутствуют в переднем мозге hTau-трансгенных мышей ВАС (трансгенной линии 510, двухмесячных самок мышей). Альтернативный спlicesинг экзонов 2, 3 и 10 давал шесть изоформ tau: 2-3-10-; 2+3-10-; 2+3+10-; 2-3-10+; 2+3-10+; 2+3+10+. 4R представляет собой изоформы tau с экзоном 10, 3R представляет собой изоформы tau без экзона 10; 0N представляет собой изоформы tau без экзона 2 и экзона 3; 1N представляет собой изоформы tau, содержащие либо экзон 2, либо экзон 3; 2N представляет собой изоформы tau, содержащие экзон 2 и экзон 3. На фиг. 2В проиллюстрирован репрезентативный Вестерн-блот-анализ, указывающий на наличие шести изоформ белка tau длиной в пределах 352-441 аминокислот с молекулярной массой 48-67 кД. Они отличаются (1) включением 0, 1 или 2 вставок в N-

концевой части из 29 аминокислот (0N, 1N или 2N), или (2) включением трех или четырех доменов, связывающихся с микротрубочками (3R или 4R). На фиг. 2С проиллюстрирован репрезентативный иммуногистохимический визуализирующий анализ, указывающий на нормальное распределение человеческого tau в аксонах головного мозга hTau-трансгенных мышей ВАС, как показало окрашивание человеческим tau-специфическим антителом. На фиг. 2D представлена гистограмма мРНК, иллюстрирующая ингибирование мРНК tau в коре головного мозга hTau-трансгенных мышей ВАС через 4 недели после одной обработки антисмысловым олигонуклеотидом, содержащим SEQ ID NO: 285. На фиг. 2Е проиллюстрирован репрезентативный Вестерн-блот-анализ, указывающий на ингибирование белка tau в гиппокампе hTau-трансгенных мышей ВАС через 4 недели после одной обработки антисмыловым олигонуклеотидом, содержащим SEQ ID NO: 285.

На фиг. 3 представлена серия изображений гибридизации *in situ*, указывающих на широкое распределение антисмылового олигонуклеотида SEQ ID NO: 285 в головном мозге hTau-трансгенных мышей ВАС.

На фиг. 4А и 4В представлены точечные графики, показывающие дозависимое ингибирование экспрессии человеческой мРНК (фиг. 4А) и человеческого белка (фиг. 4В) tau у hTau-трансгенной мыши ВАС через 4 недели или 12 недель после одной ICV-инъекции 1, 10, 50, 200 или 400 мкг антисмылового олигонуклеотида SEQ ID NO: 285.

На фиг. 5А и 5В представлены точечные графики, показывающие время, за которое наблюдался уровень экспрессии человеческой мРНК (фиг. 5А) и человеческого белка (фиг. 5В) tau у hTau-трансгенной мыши ВАС после одной ICV-инъекции 200 мкг антисмылового олигонуклеотида SEQ ID NO: 285.

Подробное описание

Настоящее изобретение относится к антисмыловым олигонуклеотидам, нацеленным на белок tau, ассоциированный с микротрубочками (МАРТ); к композициям, содержащим эти антисмыловые олигонуклеотиды, и к способам снижения уровня экспрессии tau с использованием этих антисмыловых олигонуклеотидов. Описанные здесь способы и композиции являются подходящими для лечения таусассоциированных заболеваний.

Определения.

Используемые в настоящем описании, а также в прилагаемой формуле изобретения определения, употребляемые с существительными в единственном числе, могут относиться и к существительным во множественном числе, если из контекста описания не следует обратное. Так, например, термин "клетка" включает множество клеток, в том числе их смеси.

Все численные параметры, например pH, температура, время, концентрация и молекулярная масса, включая интервалы их значений, являются приближениями и варьируются на величину $\pm 0,1$. Следует отметить, что слово "приблизительно", хотя это и не всегда четко соблюдается, ставится впереди всех числовых значений. Кроме того, следует также отметить, что описанные здесь реагенты, хотя это и не всегда конкретно указано, приводятся лишь в качестве примеров, и что специалистам известны и эквиваленты таких реагентов.

Термин "2'-модификация" означает замену Н или OH в 2' положении фуранозного кольца нуклеозида или нуклеотида другой группой.

Используемый здесь термин "2'-О-метоксиэтил", "2'-МОЕ" или "2'-OCH₂CH₂-OCH₃" означает О-метоксиэтильную модификацию в 2' положении фуранозного кольца. Модифицированный сахаром является сахар, модифицированный 2'-О-метоксиэтилом. "2'-МОЕ-нуклеозид/нуклеотид" или "2'-О-метоксиэтилнуклеозид/нуклеотид" означает нуклеозид/нуклеотид, содержащий 2'-МОЕ-модифицированную сахарную группу.

"5-Метилцитозин" означает цитозин, модифицированный метильной группой, присоединенной в 5' положении.

Используемый здесь термин "антисмыловый олигонуклеотид" означает одноцепочечный олигонуклеотид, имеющий последовательность нуклеотидных оснований, комплементарную соответствующему сегменту нукleinовой кислоты-мишени, например геномной последовательности-мишени, молекуле пре-мРНК или мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловой олигонуклеотид имеет длину от 12 до 30 нуклеотидных оснований.

Термин "комплémentарность" или "комплémentарный" относится к способности образовывать пары оснований между нуклеотидными основаниями первой цепи нукleinовой кислоты и нуклеотидными основаниями второй цепи нукleinовой кислоты посредством водородных связей (например, водородных связей Уотсона-Крика, Хугстена или обратных водородных связей Хугстен) между соответствующим нуклеотидными основаниями. Так, например, в ДНК аденин (A) является комплементарным тимину (T); а гуанозин (G) является комплементарным цитозину (C). Так, например, в РНК аденин (A) является комплементарным урацилу (U); а гуанозин (G) является комплементарным цитозину (C). В некоторых вариантах осуществления изобретения комплементарное нуклеотидное основание означает нуклеотидное основание антисмылового олигонуклеотида, способное образовывать пары оснований с нуклеотидным основанием его нукleinовой кислоты-мишени. Так, например, если нуклеотидное основание в опреде-

ленном положении антисмыслового олигонуклеотида способно образовывать водородные связи с нуклеотидным основанием в определенном положении нукleinовой кислоты-мишени, то положение водородных связей между олигонуклеотидом и нукleinовой кислотой-мишенью рассматривается как комплементарное в этой паре нуклеотидных оснований. Нуклеотидные основания, содержащие определенные модификации, могут сохранять способность спариваться с нуклеотидным основанием-аналогом и, таким образом, способны образовывать комплементарные связи с нуклеотидным основанием.

Термин "эффективное количество" означает количество, достаточное для достижения эффективных или желаемых результатов. Так, например, терапевтическим количеством является количество, обеспечивающее желаемый терапевтический эффект. Это количество может быть таким же, как профилактически эффективное количество, или оно может отличаться от этого количества, и такое количество является необходимым для предупреждения развития заболевания или его симптомов. Эффективное количество может быть введено за одно или более инъекций, нанесений или доз. "Терапевтически эффективное количество" терапевтического соединения (т.е. эффективная доза) зависит от выбранных терапевтических соединений. Композиции могут быть введены от одного или более раз в день, до одного или более раз в неделю, например один раз в день. Специалисту в данной области известно, что доза и время, необходимые для эффективного лечения индивидуума, могут зависеть от ряда факторов, включая, но не ограничиваясь ими, тяжесть заболевания или расстройства, предшествующее лечение, общее состояние здоровья и/или возраст индивидуума и другие заболевания. Кроме того, лечение индивидуума терапевтически эффективным количеством описанных здесь терапевтических соединений может включать один курс лечения или повторные курсы лечения.

Используемый здесь термин "гапмер" означает химерный антисмысловой олигонуклеотид, содержащий центральный гэп-сегмент, состоящий из смежных 2'-дезоксирибонуклеотидов, которые способны активировать РНКазу Н и фланкируются двумя сегментами крыла у 5'- и 3'-концов, каждый из которых содержит один или более модифицированных нуклеотидов, сообщающих повышенную резистентность к разложению нуклеазой.

Термин "гибридизация" означает спаривание оснований комплементарных цепей нукleinовой кислоты и образование дуплексной структуры. Гибридизация может происходить между полностью комплементарными цепями нукleinовой кислоты или между "в основном, комплементарными" цепями нукleinовой кислоты, которая содержит минорные области ошибочного спаривания. Не ограничиваясь каким-либо конкретным механизмом авторы лишь отмечают, что наиболее распространенный механизм спаривания включает образование водородных связей, которыми могут быть водородные связи Уотсон-Крика, Хугстена или обратные водородные связи Хугстена между комплементарным нуклеотидным основанием цепей нукleinовой кислоты. Так, например, аденин и тимин являются комплементарными нуклеотидными основаниями, которые спариваются посредством образования водородных связей. Гибридизация может происходить при различных условиях жесткости. Используемый здесь термин "гибридизация" означает спаривание оснований комплементарных цепей нукleinовой кислоты и образование дуплексной структуры, по меньшей мере, в условиях относительно низкой жесткости, например гибридизация в 2× SSC (0,3М хлорида натрия, 0,03М цитрата натрия), 0,1% ДСН при 37°C, с последующей промывкой в растворе, содержащем 4× SSC, 0,1% ДСН, которая может быть проведена при 37°C, и с конечной промывкой в 1× SSC при 45°C.

Термин "ингибирующий" или "ингибирование" относится к снижению или блокированию экспрессии или активности нукleinовой кислоты-мишени или белка-мишени и не обязательно указывает на полное устранение экспрессии или активности мишени.

Термин "межнуклеозидная связь" означает химическую связь между нуклеозидами.

Термин "нокдаун" или "подавление экспрессии" означает снижение уровня экспрессии гена мРНК или белка после обработки реагентом, например антисмысловым олигонуклеотидом. Подавление экспрессии может происходить во время транскрипции, сплайсинга мРНК или трансляции.

Термин "несоответствие" употребляется в том случае, когда нуклеотидные основания первой цепи нукleinовой кислоты не являются комплементарными соответствующему нуклеотидному основанию второй цепи нукleinовой кислоты.

Термин "последовательность нуклеотидных оснований" означает порядок расположения смежных нуклеотидных оснований независимо от любой модификации сахара, связи и/или нуклеотидного основания.

Термин "олигонуклеотид" означает полимер из связанных дезоксирибонуклеотидов (ДНК) и/или рибонуклеотидов (РНК), каждый из которых является модифицированным или немодифицированным. Этот термин, если это не оговорено особо, охватывает нукleinовые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают связывающими свойствами, аналогичными связывающим свойствам природной нукleinовой кислоты, а также нукleinовые кислоты, имеющие альтернативные межнуклеозидные связи, не являющиеся фосфодиэфирными связями.

Термин "фосфориоатная связь" означает связь между нуклеозидами, где фосфодиэфирная связь модифицирована путем замены одного из немостиковых атомов кислорода атомом серы.

Термин "смысловая цепь" означает кодирующую цепь, плюс-цепь или нематричную цепь молекулы ДНК, которая состоит из двухцепочечной структуры. Кодирующая цепь имеет такую же последовательность, как и последовательность мРНК за исключением того, что тимин (T), присутствующий в ДНК, заменен урацилом (U) в РНК. "Антисмыловая цепь" означает некодирующую цепь или матричную цепь молекулы ДНК, которая действует в качестве матрицы для синтеза мРНК. Следовательно, последовательность антисмыловой цепи является комплементарной последовательности смысловой цепи и мРНК (U в РНК вместо T).

Используемый здесь термин "стерический блокатор" означает антисмыловой олигонуклеотид, который гибридизуется с нуклеиновой кислотой-мишенью (например, геномной последовательностью-мишенью, молекулой пре-мРНК или мРНК) и блокирует транскрипцию, сплайсинг и/или трансляцию нуклеиновой кислоты-мишени без активации РНКазы Н.

Используемый здесь термин "нацеливание" или "нацеленный" относится к конструированию и отбору антисмылового олигонуклеотида, который может специфически гибридизоваться с нуклеиновой кислотой-мишенью, например геномной последовательностью-мишенью, молекулой пре-мРНК или мРНК или его фрагментом или вариантом, и модулирует транскрипцию, сплайсинг и/или трансляцию нуклеиновой кислоты-мишени.

Используемый здесь термин "tau" (также известный как "белок tau, ассоциированный с микротрубочками", MAPT, MSTD; PPND; DDPAC; MAPTL; MTBT1; MTBT2; FTDP-17; PPP1R103) означает белок, ассоциированный с микротрубочками и кодируемый геном MAPT. Человеческий ген MAPT картирован в хромосоме в положении 17q21.1, и геномную последовательность человеческого гена MAPT можно найти в GenBank на сайте NG_007398.1 (SEQ ID NO: 304). Последовательности инtronов и экзонов MAPT и точки ветвления могут быть определены из базы данных геномов Ensembl на web-сайте с использованием программы Transcript: MAPT-203 ENST00000344290. У человека присутствуют восемь изоформ tau, что обусловлено сложным механизмом альтернативного сплайсинга. Используемый здесь термин "tau" является собирательным термином для всех изоформ tau. Последовательности белка и мРНК для самой длинной человеческой изоформы tau представляют собой

ассоциированный с микротрубочками белок tau *Homo sapiens* (MAPT), вариант транскрипта 6, мРНК (NM_001123066.3)

```

1  ggacggccga  gcggcaggc  gctcgccgc  gcccactagt  ggccggagga
gaaggctccc
61  gcggaggccg  cgctgcccgc  cccctccctt  gggaggctc  gcgttccccgc

```

tgctcgcc
 121 tgcggcccc gcccgccta ggaacgcgcc ctttcgccg gcgcgcgc
 tcgcagtcac
 181 cgccaccac cagctccggc accaacagca gcgcgcgtgc caccgcac
 cttctgccc
 241 cgccaccaca gccacattct ctcctccgc tgtcctctcc cgtcctcgcc
 tctgtcgact
 301 atcaggtgaa ctttgaacca ggatggctga gccccgcag gagttcgaag
 tcatggaaaga
 361 tcacgctggg acgtacgggt tgggggacag gaaagatcag gggggctaca
 ccatgcacca
 421 agaccaagag ggtgacacgg acgctggcct gaaagaatct cccctgcaga
 cccccactga
 481 ggacggatct gaggAACCGG gctctgaaac ctctgatgct aagagcactc
 caacagcgg
 541 agatgtgaca gcacccttag tggatgaggg agctccggc aagcaggctg
 ccgcgcagcc
 601 ccacacggag atcccagaag gaaccacagc tgaagaagca ggcattggag
 acaccccccag
 661 cctggaagac gaagctgctg gtcacgtgac ccaagagcct gaaagtggta
 aggtggtcca
 721 ggaaggcttc ctccgagagc caggcccccc aggtctgagc caccagctca
 tgtccggcat
 781 gcctgggct cccctctgc ctgagggccc cagagaggcc acacgccaac
 cttcggggac
 841 aggacctgag gacacagagg gcggccgcca cgccctgag ctgctcaagc
 accagcttct
 901 aggagacctg caccaggagg ggccgcgcgt gaaggggca gggggcaaag
 agaggccgg
 961 gagcaaggag gaggtggatg aagaccgcga cgtcgatgag tcctcccc
 aagactcccc
 1021 tccctccaag gcctccccag cccaagatgg gcggcctccc cagacagccg
 ccagagaagc
 1081 caccagcatc ccaggcttcc cagcggaggg tgccatcccc ctccctgtgg
 atttcctctc
 1141 caaagttcc acagagatcc cagcctcaga gcccgcacggg cccagtgtag

ggcggggccaa
 1201 agggcaggat gcccccctgg agttcacgtt tcacgtggaa atcacaccca
 acgtgcagaa
 1261 ggagcaggcg cactcgaggc agcatttggg aagggctgca tttccagggg
 cccctggaga
 1321 ggggccagag gcccgcccccc cctctttggg agaggacaca aaagaggctg
 accttccaga
 1381 gccctctgaa aagcagcctg ctgctgctcc gcgggggaag cccgtcagcc
 gggtccctca
 1441 actcaaagct cgcatggtca gtaaaagcaa agacgggact ggaagcgtatg
 acaaaaaaagc
 1501 caagacatcc acacgttcct ctgctaaaac cttaaaaaat aggcccttgcc
 ttagccccaa
 1561 acacccact cctggtagct cagaccctct gatccaaccc tccagccctg
 ctgtgtgccc
 1621 agagccacct tccttccta aatacgtctc ttctgtcaact tcccgaactg
 cgagttctgg
 1681 agcaaaggag atgaaactca agggggctga tggtaaaacg aagatcgcca
 caccgcgggg
 1741 agcagccct ccaggccaga agggccaggc caacgccacc aggattccag
 caaaaaacccc
 1801 gcccgtcca aagacaccac ccagctctgc gactaagcaa gtccagagaa
 gaccacccccc
 1861 tgcagggccc agatctgaga gaggtgaacc tccaaaatca ggggatcgca
 gcggctacag
 1921 cagccccggc tccccaggca ctcccggcag ccgctcccgcc accccgtcccc
 ttccaaacccc
 1981 acccacccgg gagcccaaga aggtggcagt ggtccgtact ccacccaagt
 cgccgtcttc
 2041 cgccaagagc cgcctgcaga cagccccgt gcccatgcca gacctgaaga
 atgtcaagtc
 2101 caagatggc tccactgaga acctgaagca ccagccggga ggccggaaagg
 tgcaagataat
 2161 taataagaag ctggatctta gcaacgtcca gtccaaagtgt ggctcaaagg
 ataatatcaa
 2221 acacgtcccg ggaggcggca gtgtgcaaatt agtctacaaa ccagttgacc

tgagcaagg
2281 gacctccaag tgtggctcat taggcaacat ccatcataaa ccaggaggtg
gccaggtgga
2341 agtaaaatct gagaagctt acttcaagga cagagtccag tcgaagattg
ggtcccctgga
2401 caatatcacc cacgtccctg gcggaggaaa taaaaagatt gaaaccac
agctgaccc
2461 ccgcgagaac gccaaagcca agacagacca cggggcggag atcgtgtaca
agtcgccc
2521 ggtgtctggg gacacgtctc cacggcatct cagcaatgtc tcctccacc
gcagcatcg
2581 catggtagac tcgccccagc tcgcccacgct agctgacgag gtgtctgcct
ccctggccaa
2641 gcagggtttg tgcgtcaggcc cctggggcg tcaataattt tggagaggag
agaatgagag
2701 agtgtggaaa aaaaaagaat aatgaccgg ccccccgcct ctgccccag
ctgctcctcg
2761 cagttcggtt aattggtaa tcacttaacc tgctttgtc actcggctt
ggctcgggac
2821 ttcaaaaatca gtgatggag taagagcaaa tttcatctt ccaaattgat
gggtgggcta
2881 gtaataaaat attaaaaaaaaa aaacattcaa aaacatggcc acatccaaca
tttcctcagg
2941 caattccctt tgattcttt ttctcccccc tccatgtaga agagggagaa
ggagaggctc
3001 tgaaagctgc ttctggggaa tttcaaggga ctgggggtgc caaccac
tggccctgtt
3061 gtgggggtgt cacagaggca gtggcagcaa caaaggattt gaaacttgg
gtgttcgtgg
3121 agccacaggc agacgatgtc aaccttgtt gagtgacg ggggttgggg
tggggcggga
3181 ggccacgggg gaggccgagg caggggctgg gcagagggga gaggaagcac
aagaagtggg
3241 agtggagag gaagccacgt gctggagagt agacatcccc ctccttgc
ctggagagc
3301 caaggcctat gccacctgca gcgtctgagc ggccgcgtt cttgggtggc

cgggggtggg
 3361 ggcctgctgt gggtcagtgt gccaccctct gcagggcagc ctgtgggaga
 agggacagcg
 3421 ggtaaaaaga gaaggcaagc tggcaggagg gtggcacttc gtggatgacc
 tccttagaaa
 3481 agactgacct tcatgtcttg agagcgctgg cctcttcctc cttccctgca
 gggtaggggg
 3541 cctgagttga ggggcttccc tctgctccac agaaaccctg ttttatttag
 ttctgaaggt
 3601 tggaactgct gccatgattt tggccacttt gcagacctgg gacttttaggg
 ctaaccagtt
 3661 ctcttgtaa ggacttgtgc ctcttggag acgtccaccc gtttccaagc
 ctgggccact
 3721 ggcatctctg gagtgtgtgg gggctggga ggcaggtccc gagccccctg
 tccttcccac
 3781 gcccactgca gtcacccgt ctgcggcgt gtgtgttgt ctgcgttag
 agcccaatca
 3841 ctgcctatac ccctcatcac acgtcacaat gtcccgaatt cccagccta
 ccaccccttc
 3901 tcaaatgatccctgggttgg ttgcaggagg tacctactcc atactgaggg
 tgaaatthaag
 3961 ggaaggcaaa gtccaggcac aagagtggga cccagcctc tcactctcag
 ttccactcat
 4021 ccaactggga ccctcaccac gaatctcatg atctgattcg gttccctgtc
 tcctcctccc
 4081 gtcacagatg tgagccaggc cactgctcag ctgtgaccct aggtgtttct
 gccttggta
 4141 catggagaga gccctttccc ctgagaaggc ctggccccctt cctgtgctga
 gcccacagca
 4201 gcaggctggg tgtctgggtt gtcagtggtg gcaccaggat ggaaggcaaa
 ggcacccagg
 4261 gcaggccac agtcccgctg tccccactt gcaccctagc ttgtagctgc
 caacctccca
 4321 gacagcccag cccgctgctc agtccacat gcatagtatac agccctccac
 acccgacaaa
 4381 gggaaacaca ccccccttggaa aatggttctt ttccccctgt cccagctggaa

agccatgctg
4441 tctgttctgc tggagcagct gaacatatac atagatgttg ccctgccctc
cccatctgca
4501 ccctgttgag ttgttagttgg atttgtctgt ttatgcttgg attcaccaga
gtgactatga
4561 tagtaaaaag aaaaaaaaaa aaaaaaaaaagg acgcatgtat cttgaaatgc
ttgttaaagag
4621 gtttctaacc caccctcacg aggtgtctct cacccccaca ctgggactcg
tgtggcctgt
4681 gtgggtccac cctgctgggg cctcccaagt tttgaaaggc tttcctcagc
acctgggacc
4741 caacagagac cagcttctag cagctaagga ggcgcgttcag ctgtgaccaa
ggcctgaagc
4801 acaggattag gactgaagcg atgatgtccc cttccctact tccccttggg
gctccctgtg
4861 tcagggcaca gactaggctct tgtggctggc ctggcttgcg gcgcgaggat
ggttctctct
4921 ggtcatagcc cgaagtctca tggcagtccc aaaggaggct tacaactcct
gcatcacaag
4981 aaaaaggaag ccactgccag ctggggggat ctgcagctcc cagaagctcc
gtgagcctca
5041 gccaccctc agactgggtt cctctccaag ctcgcctct ggaggggcag
cgcagcctcc
5101 caccaagggc cctgcgacca cagcagggat tggatgaat tgcctgtcct
ggatctgctc
5161 tagaggccc a gactgcctgc ctgaggaagg atgacttgac aagttaggag
acactgttcc
5221 caaagccttg accagagcac ctcagccgc tgaccttgca caaactccat
ctgctgccc
5281 gagaaaaggg aagccgcctt tgcaaaacat tgctgcctaa agaaactcag
cagcctcagg
5341 cccaaattctg ccacttctgg tttgggtaca gttaaaggca accctgaggg
acttggcagt
5401 agaaatccag ggcctccct ggggctggca gcttcgttg cagctagagc
tttacctgaa
5461 aggaagtctc tggcccaaga actctccacc aagagcctcc ctgcccgttcg

ctgagtc
 5521 gcaattctcc taagttgaag ggatctgaga aggagaagga aatgtgggg
 agatttggtg
 5581 gtggtagag atatgccccc ctcattactg ccaacagttt cggctgcatt
 tcttcacgca
 5641 cctcggttcc tttcctgaa gttcttgtgc cctgctttc agcaccatgg
 gccttcttat
 5701 acggaaggct ctggatctc ccccttgtgg ggcaggctct tggggccagc
 ctaagatcat
 5761 ggttagggt gatcagtgtc ggcagataaa ttgaaaaggc acgctggctt
 gtgatcttaa
 5821 atgaggacaa tccccccagg gctgggact cctccctcc cctcaacttct
 cccacctgca
 5881 gagccagtgt cttgggtgg gctagatagg atatactgt a tgccggctcc
 ttcaagctgc
 5941 tgactcaatt tatcaatagt tccatttaaa ttgacttcag tggtagact
 gtatcctgtt
 6001 tgctattgtc tggtgtcta tggggggagg ggggaggaat gtgtaagata
 gttaacatgg
 6061 gcaaaggag atctgggt gcagcactta aactgcctcg taacccttt
 catgatttca
 6121 accacatttgc tagagggag ggagcagcca cggagtttga ggcccttgg
 gtttctttt
 6181 tccactgaca ggcttccca ggcagctggc tagttcattt cctcccccagc
 caggtgcagg
 6241 cgttagaata tggacatctg gttgtttgg cctgctgccc tcttcaggg
 gtcctaagcc
 6301 cacaatcatg cttccctaag accttggcat cttccctct aagccgttgg
 cacctctgtg
 6361 ccacctctca cactggctcc agacacacag cctgtgttt tggagctgag
 atcactcgct
 6421 tcaccctcct catttgtt ctccaagtaa agccacgagg tcggggcag
 ggcagaggtg
 6481 atcacctgctg tgtccatct acagacactgc agttcataa aacttctgat
 ttctcttcag
 6541 cttgaaaag gttaccctg ggcactggcc tagagcctca cttccctaata
 gacttagccc
 6601 catgagtttgc ccatgttgag caggactatt tctggcactt gcaagtc
 tgatttcttc
 6661 ggttaattctg agggtggggg gagggacatg aaatcatctt agcttagctt
 tctgtctgtg
 6721 aatgtctata tagtgtatttgc tttttttttt caaatgattt acactgactg
 ttgtgttaaa
 6781 agtgaatttgc gaaataaaatg tattactctg attaaa (SEQ ID NO:
 305)

Ассоциированный с микротрубочками белок tau Homo sapiens, изоформа 6 (NP_001116538.2)

| MAEPQEFEV | MEDHAGTYGL | GDRKDQGGYT | MHQDQEGLTD | AGLKESPLQT |
|-------------|------------|------------|-------------|------------|
| PTEDGSEEPG | SETSDAKSTP | TAEDVTAPLV | DEGAPGKQAA | AQPHTEIPFG |
| TTAEEAGIGD | TPSLEDEAAG | HVTQEPESGK | VVQEGLFLREP | GPPGLSHQLM |
| SGMPGAPLLP | EGPREATRQP | SGTGPDTEG | GRHAPELLKH | QLLGDLHQEG |
| PPLKGAGGKE | RPGSKEEVDE | DRDVDESSPQ | DSPPSKASPA | QDGRPPQTAA |
| REATSIPGFP | AEGAIPLPVD | FLSKVSTEIP | ASEPDGPSVG | RAKGQDAPLE |
| FTFHVEITPN | VQKEQAHSEE | HLGRAAFPGA | PGEGLPEARGP | SLGEDTKEAD |
| LPEPSEKQPA | AAPRGKPVSR | VPQLKARMVS | KSKDGTGSDD | KKAKTSTRSS |
| AKTLKNRPCL | SPKHPTPGSS | DPLIQPSSPA | VCPEPPSSPK | YVSSVTSRTG |
| SSGAKEMKLK | GADGKTKIAT | PRGAAPPQK | GQANATRIPA | KTPPAPKTTP |
| SSATKQVQRR | PPPAGPRSER | GEPPKSGDRS | GYSSPGSPGT | PGSRSRTPSL |
| PTPPTRPDKK | VAVVRTPPKS | PSSAKSRLQT | APVPMPLKN | VKSIGSTEN |
| LKHQPQGGGKV | QIINKKLDLS | NVQSKCGSKD | NIKHVPGGGS | VQIVYKPVDL |
| SKVTSKCGSL | GNIHHKPGGG | QVEVKSEKLD | FKDRVQSKIG | SLDNITHVPG |
| GGNKKIETHK | LTFRENAAK | TDHGAEIVYK | SPVVSGDTSP | RHLSNVSSTG |

SIDMVDSQL ATLADEVSAS LAKQGL (SEQ ID NO: 306)

Последовательности мРНК и белка других человеческих изоформ tau можно найти в GenBank под следующими регистрационными номерами:

- изоформа tau 1: NM_016835.4 (мРНК)® NP_058519.3 (белок);
- изоформа tau 2: NM_005910.5 (мРНК)® NP_005901.2 (белок);
- изоформа tau 3: NM_016834.4 (мРНК)® NP_058518.1 (белок);
- изоформа tau 4: NM_016841.4 (мРНК) ® NP_058525.1 (белок);
- изоформа tau 5: NM_001123067.3 (мРНК)® NP_001116539.1 (белок);
- изоформа tau 7: NM_001203251.1 (мРНК)® NP_001190180.1 (белок);
- изоформа tau 8: NM_001203252.1 (мРНК)® NP_001190181.1 (белок).

Используемый здесь термин "человеческий белок tau" также охватывает белки, которые по всей их длине по меньшей мере приблизительно на 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны последовательности любой изоформы tau. Последовательности белков tau мышей, собакоподобных обезьян и других животных известны специалистам.

Используемый здесь термин "tau-ассоциированное заболевание" включает, но не ограничивается им, заболевание, ассоциированное с аномальной экспрессией, секрецией, фосфорилированием, расщеплением и/или агрегацией белка tau. Tau-ассоциированными заболеваниями являются, но не ограничиваются ими, болезнь Альцгеймера (БА), амиотрофический боковой склероз/комплекс паркинсонизма-деменция (АБС-КПД), деменция в области аргирофильных зерен (ДАГЗ), амилоидная ангиопатия британского типа, церебральная амилоидная ангиопатия, хроническая травматическая энцефалопатия (ХТЭ), кортико базальная дегенерация (КБД), болезнь Крейцфельда-Якоба (БКЯ), деменция боксеров, диффузные повреждения нейрофибрillaryных клубков с кальцификацией, синдром Дауна, синдром Дравета, эпилепсия, деменция в области лобно-височной доли (ДЛВД), деменция в области лобно-височной доли, ассоциированная с паркинсонизмом, сцепленным с хромосомой 17 (FTDP-17), дегенерация передней лобно-височной доли, ганглиоглиома, ганглиоцитома, болезнь Герстманна-Штраусслера-Шейнкера, болезнь Галервортена-Шпатца, болезнь Гентингтона, миозит, вызываемый тельцами включения, энцефалопатия, вызываемая свинцом, болезнь Литико-Бодига, менингиоангиоматоз, атрофия многих органов, миотоническая дистрофия, болезнь Нимана-Пика типа С (НП-С), не-гваманиеевомое заболевание двигательных нейронов, ассоциированное с поражением нейрофибрillaryных клубков, болезнь Пика (БП), постэнцефалитный паркинсонизм, церебральная амилоидная ангиопатия, вызываемая белками прионами, прогрессирующий субкортикальный глиоз, прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП), подострый склерозирующий панэнцефалит, деменция, поражающая только область клубков, деменция, преобладающая в области клубков, мультиинфарктная деменция, ишемический инсульт или клубневой склероз.

Термин "гомология" или "идентичность" означает идентичность последовательности субъединиц двух полимерных молекул, например двух молекул нуклеиновой кислоты, таких как две молекулы ДНК, две молекулы РНК или две молекулы полипептида. Если положение субъединиц в обеих двух молекулах занято одни и той же мономерной субъединицей, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, то они являются гомологичными или идентичными в этом положении. Гомология двух последовательностей непосредственно зависит от числа совпадающих или гомологичных положе-

ний, например, если половина положений (например, пять положений в полимере длиной в десять субъединиц) в двух последовательностях являются гомологичными, то эти две последовательности являются гомологичными на 50%; а если 90% положений (например, 9 из 10) являются соответствующими или гомологичными, то эти две последовательности гомологичны на 90%. Процент "идентичности последовательностей" может быть определен путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей по окну сравнения, где для такого оптимального выравнивания двух последовательностей, фрагмент аминокислотной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (например, пробелы или выступающие концы) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавлений или делеций). Процент может быть вычислен путем определения числа положений, в которых присутствуют идентичные аминокислотные остатки в обеих последовательностях, с получением числа совпадающих положений, а затем деления этого числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения, и умножения результата на 100 с получением процента идентичности последовательностей. Конечный результат представляет собой процент идентичности рассматриваемой последовательности с запрашиваемой последовательностью.

Термин "выделенный" означает измененный или удаленный из природного окружения. Так, например, нукleinовая кислота или пептид, присутствующие в природе в организме животного, не являются "выделенными", но та же нукleinовая кислота или тот же пептид, которые частично или полностью отделены от продуктов, совместно существующих с ними в их природном окружении, являются "выделенными". Выделенная нукleinовая кислота или белок могут существовать, в основном, в очищенной форме, либо они могут присутствовать в ненативной среде, такой как, например, клетка-хозяин.

Термин "лечить" или "лечение" относится как к терапевтическому лечению, так и профилактическим или превентивным мерам, целью которых является предупреждение или замедление нежелательного патологического изменения или расстройства. В соответствии с целями настоящего изобретения благоприятные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничиваются ими, ослабление симптомов, снижение тяжести заболевания, стабилизацию (т.е. не ухудшение) состояния болезни, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение патологического состояния и ремиссию (частичную или полную), независимо от того, являются ли они детектируемыми или недетектируемыми. "Лечение" может также означать увеличение продолжительности жизни по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни в случае отсутствия лечения.

Термин "индивидуум" относится к животному, человеку или животному, не являющемуся человеком, которые подвергаются лечению описанными здесь способами согласно изобретению. Настоящее изобретение может быть также применено в ветеринарии и в области, не относящейся к ветеринарии. Этот термин включает, но не ограничивается ими, млекопитающих, например человека; других приматов, свиней, грызунов, таких как мыши и крысы, кролики, морские свинки, и хомяки; коров, лошадей, кошек, собак, овец и коз. Типичными индивидуумами являются человек, сельскохозяйственные животные и домашние питомцы, такие как кошки и собаки.

Если это не оговорено особо, то все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют значения, в основном, понятные среднему специалисту в области, к которой относится изобретение. Хотя для осуществления настоящего изобретения могут быть применены методы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным здесь методам и материалам, однако подходящие методы и материалы описаны ниже. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие упомянутые здесь документы во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки. В случае возникновения каких-либо разночтений, следует отдать предпочтение определениям, данным в настоящей заявке. Кроме того, материалы, способы и примеры приводятся лишь в иллюстративных целях и не рассматриваются как ограничение объема изобретения.

Подробное описание одного или более вариантов осуществления изобретения приводится в прилагаемых чертежах и в нижеследующем описании. Другие признаки, цели и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из описания и чертежей, а также из формулы изобретения.

Антисмысловые олигонуклеотиды.

Антисмысловые олигонуклеотиды (ASO) являются мощными и универсальными агентами, которые находят все большее применение, включая снижение уровня РНК, остановку трансляции, ингибиование миРНК, модуляцию сплайсинга и выбор сайта полиаденилирования. Антисмысловой олигонуклеотид связывается с нукleinовой кислотой-мишенью, если достаточное число нуклеотидных оснований антисмыслового олигонуклеотида может образовывать водородные связи с соответствующими нуклеотидными основаниями нукleinовой кислоты-мишени и модулирует транскрипцию и/или трансляцию нукleinовой кислоты-мишени. Таким образом, последовательность нуклеотидных оснований антисмыслового олигонуклеотида является комплементарной последовательности нуклеотидных оснований нуклеотидной нукleinовой кислоты-мишени, например геномной последовательности-мишени, молекулы пре-мРНК или мРНК. Гибридизация происходит в случае образования водородных связей (например, водородных связей Уотсона-Крика, водородных связей Хугстена или обратных водородных связей Хугстена) между комплементарными нуклеотидными основаниями антисмыслового олигонуклеотида и нукleinовой кислоты-мишени. При этом могут быть использованы некомплémentарные нуклеотидные основания

антисмылового олигонуклеотида и нукleinовой кислоты-мишени при условии, что антисмыловой олигонуклеотид будет сохранять способность специфически гибридизоваться с нукleinовой кислотой-мишенью.

ASO могут быть сконструированы в целях снижения уровня экспрессии белка-мишени по механизму, зависящему от РНКазы Н или не зависящему от РНКазы Н (см. Watts J.K., et al., J. Pathol. 2012 Januагу; 226(2): 365-379). Если ASO, содержащий непрерывный фрагмент ДНК, гибридизуется с РНК-мишенью, то гетеродуплекс ДНК-РНК обеспечивает рекрутинг РНКазы Н, которая расщепляет РНК-мишень в дуплексе и способствует последующему разложению РНК-фрагментов клеточными нуклеазами. ASO может также уменьшать уровень экспрессии мишени независимо от РНКазы Н посредством стерического блокирования процессинга пре-мРНК и/или трансляции мРНК в белок.

Настоящее изобретение относится к антисмыловым олигонуклеотидам, нацеленным на белок tau, ассоциированный с микротрубочками, (МАРТ). В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды имеют последовательность нуклеотидных оснований, комплементарную сегменту геномной ДНК МАРТ, пре-мРНК или мРНК с 1, 2, 3, 4 или 5 несоответствиями. Если происходит полное спаривание оснований (например, спаривание между А и Т, а также между С и G), то несоответствие между олигонуклеотидом и соответствующей нукleinовой кислотой-мишенью отсутствует. Несоответствие возникает в том случае, когда нуклеотидное основание первой нукleinовой кислоты неспособно спариваться с соответствующим нуклеотидным основанием второй нукleinовой кислоты при максимальном выравнивании двух последовательностей. Так, например, если в положении первой последовательности присутствует нуклеотидное основание А, а в соответствующем положении второй последовательности присутствует нуклеотидное основание (например, С или G), которое не может образовывать пару с А, то это указывает на несоответствие. Несоответствие также возникает в том случае, когда в положении в одной последовательности присутствует нуклеотидное основание, а в соответствующем положении другой последовательности такое нуклеотидное основание отсутствует. Модификация сахарной группы с нуклеотидными или межнуклеозидными связями не считается несоответствием. Таким образом, если одна последовательность содержит G, а соответствующее нуклеотидное основание второй последовательности содержит модифицированный С (например, 5-метилцитозин), то такое несоответствие не будет учитываться.

Что касается фрагмента нукleinовой кислоты, то описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды являются комплементарными сегменту геномной ДНК МАРТ, пре-мРНК или мРНК по меньшей мере на 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% по всей длине сегмента. Процент комплементарности антисмылового олигонуклеотида с нукleinовой кислотой-мишенью может быть определен рутинными методами, например, с помощью программ BLAST (пакета программ для поиска локального выравнивания) или программ PowerBLAST, известных специалистам (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656). В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды имеют последовательность нуклеотидных оснований, которая на 100% комплементарна (т.е. полностью комплементарна) сегменту геномной ДНК МАРТ, пре-мРНК или мРНК. Используемый здесь термин "полностью комплементарный" или "комплементарный на 100%" относится к каждому нуклеотидному основанию антисмылового соединения, способному точно спариваться с соответствующими нуклеотидными основаниями нукleinовой кислоты-мишени. Так, например, антисмыловое соединение в 20 нуклеотидных оснований является полностью комплементарным последовательности-мишени длиной в 400 нуклеотидных оснований, при условии, что соответствующая часть нукleinовой кислоты-мишени в 20 нуклеотидных оснований будет полностью комплементарна антисмыловому соединению.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды содержат последовательность нуклеотидных оснований, комплементарную по меньшей мере 12 смежным нуклеотидным основаниям (например, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 смежным нуклеотидным основаниям) любой последовательности, представленной в табл. 1, с 1, 2 или 3 несоответствиями. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды содержат последовательность нуклеотидных оснований, которая на 100% комплементарна по меньшей мере 12 смежным нуклеотидным основаниям (например, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 смежным нуклеотидным основаниям) любой последовательности, представленной в табл. 1.

Описанные здесь антисмыловые соединения могут также иметь определенный процент идентичности конкретной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO или его части. Используемый здесь антисмыловый олигонуклеотид идентичен описанной здесь последовательности, если он обладает такой же способностью спариваться с нуклеотидными основаниями. Так, например, РНК, которая содержит урацил вместо тимидина, присутствующего в описанной ДНК-последовательности, будет рассматриваться как последовательность, идентичная последовательности ДНК, поскольку урацил и тимидин спариваются с аденином. Также рассматриваются укороченные и удлиненные варианты описанных здесь антисмыловых олигонуклеотидов, а также олигонуклеотидов, основания которых не идентичны основаниям описанных здесь антисмыловых олигонуклеотидов. Неидентичные основания могут быть смежными друг с другом, либо они могут быть распределены по всем антисмыловым олигонуклеотидам.

Процент идентичности последовательностей антисмыловых олигонуклеотидов может быть вычислен по числу оснований, которые имеют пары оснований, идентичные парам оснований в сравниваемой последовательности. Процент идентичности последовательностей может быть определен рутинными методами, например, с помощью программ BLAST (пакета программ для поиска локального выравнивания) или программ PowerBLAST, известных специалистам (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656) или программы Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), с использованием параметров по умолчанию, которые входят в алгоритм Смита и Уотермана (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489).

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к антисмыловым олигонуклеотидам, содержащим последовательность нуклеотидных оснований, которая по меньшей мере на 70% (например, на 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%) идентична любым последовательностям нуклеотидных оснований, представленным в табл. 2-17, где С в любых последовательностях нуклеотидных оснований представляют собой либо цитозин, либо 5-метилцитозин, и где по меньшей мере один нуклеотид этого олигонуклеотида имеет 2'-модификацию. В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к антисмыловым олигонуклеотидам, содержащим последовательность нуклеотидных оснований, которая по меньшей мере на 90% (например, на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%) идентична любым последовательностям нуклеотидных оснований, представленным в табл. 2-17. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, включают любые последовательности нуклеотидных оснований, представленные в табл. 2-17. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, состоят из любых последовательностей нуклеотидных оснований, представленных в табл. 2-17.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды имеют длину от 12 до 30 нуклеотидных оснований. Так, например, антисмыловой олигонуклеотид, нацеленный на МАРТ, может включать 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидных оснований. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, имеют длину от 12 до 25 нуклеотидных оснований. Так, например, антисмыловой олигонуклеотид, нацеленный на МАРТ, может включать 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидных оснований. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, имеют длину от 15 до 20 нуклеотидных оснований. Так, например, антисмыловой олигонуклеотид, нацеленный на МАРТ, может включать 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидных оснований. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, включают 17 нуклеотидных оснований. Длина антисмылового олигонуклеотида может быть увеличена или уменьшена, и/или в антисмыловой олигонуклеотид могут быть введены несоответствующие основания (например, 1, 2, 3, 4 или 5 несоответствий) без элиминации их активности.

Химическая модификация антисмыловых олигонуклеотидов.

Олигонуклеотиды состоят из повторяющихся нуклеотидных звеньев, которые связаны между собой межнуклеозидными фосфодиэфирными связями. Каждый нуклеотид состоит из нуклеозида, который включает нуклеотидное основание, связанное с сахарной группой, и одну или более фосфатных групп, ковалентно связанных с сахарной группой. Фосфодиэфирные связи состоят из сахарных остатков (либо рибозы для РНК, либо дезоксирибозы для ДНК, имеющих общее название "фураноза"), связанных гликозидной связью с пуриновым основанием (гуанином и/или аденином) и/или пириимидиновым основанием (тимином и цитозином для ДНК; и урацилом и цитозином для РНК).

Описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды могут содержать одну или более модифицированных нуклеотидных субъединиц и/или межнуклеозидных связей. Химические модификации в олигонуклеотидах включают модификации в межнуклеозидных связях, сахарных группах, нуклеотидных основаниях и/или в остовах. Модификации могут повышать стабильность, эффективность и/или снижать иммуногенность антисмыловых олигонуклеотидов. Так, например, олигонуклеотиды могут быть модифицированы так, чтобы это приводило к повышению резистентности к нуклеазам, к повышению аффинности связывания с нукleinовой кислотой-мишенью, к повышению уровня клеточного поглощения и/или к повышению ингибирующей активности по сравнению с немодифицированными олигонуклеотидами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды включают природные фосфодиэфирные межнуклеозидные связи. Фосфодиэфирные связи могут быть заменены другими фосфорсодержащими связями, такими как фосфоэтиоатные, фосфотриэфирные, метилфосфонатные или фосфорамидатные связи или связи, не содержащие фосфора. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды включают одну или более модифицированных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды включают фосфоэтиоатные связи. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая межнуклеозидная связь антисмылового олигонуклеотида

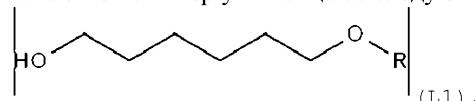
представляет собой фосфортиоатную межнуклеозидную связь.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды включают химически модифицированные сахарные группы. Так, например, антисмыловые олигонуклеотиды могут включать 2'-модификацию на фуранозном кольце, мостиковую связь негеминальных кольцевых атомов с образованием бициклических нуклеиновых кислот (BNA), и замену кольцевого атома кислорода сахара другими атомами или их комбинациями. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый нуклеотид антисмылового олигонуклеотида имеет 2'-модифицированные фуранозное кольцо. Примерами 2'-модификаций являются 2'-фтор, 2'-дезокси-2'-фтор, 2'-O-метил, 2'-O-метоксиэтил (2'-O-MOE), 2'-O-аминопропил (2'-O-AP), 2'-O-диметиламиноэтил (2'-O-DMAOE), 2'-O-диметиламинопропил (2'-O-DMAP), 2'-O-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-O-DMAEAE) и 2'-O-N-метилацетамило (2'-O-NMA). В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый нуклеотид антисмылового олигонуклеотида имеет 2'-O-MOE-модификацию в сахарной группе.

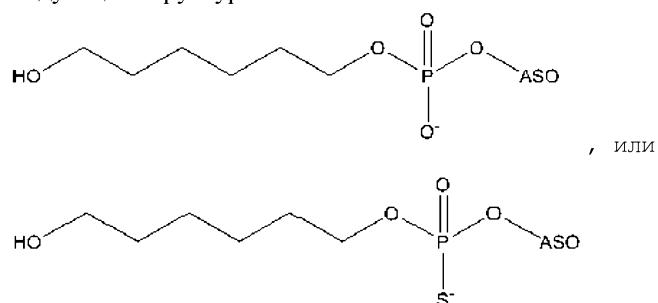
В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды могут включать замену нуклеотида в заданном положении модифицированным вариантом того же самого нуклеотида. Так, например, нуклеотид (A, G, C или T) может быть заменен соответствующим гипоксантином, ксантином, 4-ацетилцитозином, β -D-галактозилквеозином, инозином, N6-изопентениладенином, 1-метилгуанином, 1-метилинозином, 2,2-диметилгуанином, 2-метиладенином, 2-метилгуанином, 3-метилцитозином, 5-метилцитозином, N6-аденином, 7-метилгуанином, β -D-маннозилквеозином, 2-метилтио-N6-изопентениладенином, вибутоксозином, квеозином, 2-тиоцитозином или 2,6-диаминопурином.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды включают химически модифицированные олигонуклеотиды, которые снижают иммуногенность олигонуклеотидов. Так, например, было показано, что олигонуклеотиды, содержащие 5-метилцитозин или модификации 2'-O-MOE-модификации, обладают пониженной иммунной стимуляцией у мышей (Henry S. et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 2000 Feb; 292(2):468-79). В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды содержат 5-метилцитозины вместо цитозинов. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды включают 2'-O-MOE-модификации. В некоторых вариантах осуществления изобретения описаные здесь антисмыловые олигонуклеотиды включают 5-метилцитозины и 2'-MOE-модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, включают С6-линкер у 3'-конца со следующей структурой:



которая присоединена к 3'-концу олигонуклеотида посредством фосфатного мостика, где R=PO₂-O-олигонуклеотид (для фосфодиэфирных межнуклеозидных связей) или R=POS-O-олигонуклеотид (для фосфортиоатных межнуклеозидных связей). Такой 3'-C6-линкер может блокировать 3'-экзонуклеазную атаку и, следовательно, повышать стабильность и длительность действия антисмыловых олигонуклеотидов (см. WO 2005/021749 для аналогичной стратегии применительно к киРНК). В некоторых случаях 3'-C6-линкер может также облегчать синтез и/или очистку антисмыловых олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, могут иметь любую из следующих структур:



В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды могут включать альтернативный остов, например морфолино, блокированную нуклеиновую кислоту (LNA), неблокированную нуклеиновую кислоту (UNA), треозосодержащую нуклеиновую кислоту (TNA), гликольсодержащую нуклеиновую кислоту (GNA) и/или пептидсодержащую нуклеиновую кислоту (PNA). В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды могут включать бициклический нуклеозид (BNA), содержащий мостик, соединяющий два атома углерода сахарного кольца. Так, например, такой BNA может включать "стрически затрудненный этил" (или "cEt"), содержащий 4'-CH(CH₃)-O-2'-мостик, соединяющий 4'-углерод и 2'-углерод сахарной

группы. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды могут включать блокированную нукleinовую кислоту (LNA), содержащую мостик, соединяющий два атома углерода между 4' и 2' положениями нуклеозидного сахарного звена. Такая LNA может включать α -L-метиленокси-(4'-CH₂-O-2')-LNA, β -D-метиленокси-(4'-CH₂-O-2')-LNA, этиленокси-(4'-(CH₂)₂-O-2')-LNA, аминоокси-(4'-CH₂-O-N(R)-O-2')-LNA, оксиамино-(4'-CH₂-N(R)-O-2')-LNA или любую другую LNA, описанную в патентах США №№ 7053207, 6268490; 6770748; 6794499; 7034133; 6525191; 7696345; 7569575; 7314923; 7217805; 7084125 или 6670461; и в патентных публикациях WO 98/39352 или WO 99/14226. Другие подходящие LNA включают LNA, описанные Braasch et al., Chern. Biol. 8: 1-7, 2001; Elayadi et al., Curr. Opinon Inven. Drugs 2: 558-561, 2001; Frieden et al., Nucleic Acids Research, 21: 6365-6372, 2003; Koshkin et al., Tetrahedron, 54: 3607-3630, 1998; Morita et al., Bioorganic Medicinal Chemistry, 11: 2211-2226, 2003; Orum et al., Curr. Opinon Mol. Ther. 3: 239-243, 2001; Singh et al., Chem. Commun. 4: 455-456, 1998; Singh et al., J. Org. Chem., 63: 10035-10039, 1998; или Wahlestedt et al., PNAS 97: 5633-5638, 2000.

Стерические блокаторы.

Антисмыловой олигонуклеотид может связываться с нукleinовой кислотой-мишенью и стерически блокировать доступ ДНК- или РНК-связывающихся белков, транскрипционных факторов, факторов сплайсинга, рибосомы и/или блокировать механизм трансляции в нукleinовую кислоту-мишень и, таким образом, снижать уровень экспрессии мишени без активации РНКазы Н. Так, например, такие стерические блокаторы могут снижать уровень экспрессии белка-мишени посредством гибридизации последовательностей, окружающих стар-кодон мишени, блокирования инtronных последовательностей точек ветвления, нацеливания на сайты сплайсинга, объединения инtronных и/или экзонных последовательностей или нацеливания на регуляторные последовательности, такие как энхансеры сплайсинга экзона.

Стерические блокаторы могут быть сконструированы на основе ранее определенных или предсказанных границ инtron-экзон и структуры генов; и панель различных антисмыловых олигонуклеотидов может быть получена для блокирования того же сайта. Для минимизации гибридизации соединений, не являющихся мишениями, для каждого ASO могут быть проведены анализы BLAST.

Стерические блокаторы могут снижать уровни мРНК посредством использования эндогенных клеточных путей надзора, которые распознают и разлагают aberrантные мРНК. Одним из таких путей является nonсенс-опосредованный распад мРНК (NMD), который модулирует экспрессию гена и предотвращает продуцирование потенциально токсичных белков из мРНК. Дефекты процессинга пре-мРНК могут приводить к потери функции белка, если вводится кодон преждевременной терминации (PCT), который разрушает открытую рамку считывания. Такая PCT-содержащая мРНК может служить субстратом для NMD, который включает взаимосвязь между трансляцией рибосом и компонентами комплекса стыка экзонов, включая основной фактор NMD UPF1, что приводит к разложению РНК под действием эндонуклеазной и экзонуклеазной активности. ASO могут быть рационально сконструированы так, чтобы они снижали уровни мРНК-мишени посредством нацеливания мРНК-мишени на путь NMD. Это может быть достигнуто путем конструирования последовательностей стерических блокаторов так, чтобы они были комплементарны специфическим кодирующим экзонам, стыкам инtron-экзон или другим последовательностям, необходимым для правильного процессинга пре-мРНК и для введения делеции в экзон, сдвига рамки считывания и/или включения PCT.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, представляют собой стерические блокаторы, например олигонуклеотиды, содержащие последовательность нуклеотидных оснований, которая по меньшей мере на 70% (например, на 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%) идентична любым последовательностям нуклеотидных оснований, представленным в любых табл. 2-8. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, представляют собой стерические блокаторы, которые содержат любые последовательности нуклеотидных оснований, представленные в табл. 2-8. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, представляют собой стерические блокаторы, состоящие из любых последовательностей нуклеотидных оснований, представленных в табл. 2-8. Как подробно описано в приведенных ниже примерах, стерические блокаторы были сконструированы так, чтобы они были нацелены на конститутивные экзоны tau (например, экзоны 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 13), последовательности, объединяющие старт-кодон МАРТ, акцепторы и доноры сплайсинга, точки ветвления при сплайсинге, последовательности, родственные полипиримидиновому пути, или последовательности-энхансеры или ингибиторы сплайсинга.

Нацеливание на старт-кодон и экзон 1 может блокировать инициацию трансляции. ASO, которые препятствуют сплайсингу и/или индуцируют вырезание экзонов, будут способствовать сдвигу рамки считывания и/или введению ниже расположенного преждевременного стоп-кодона, что будет приводить к снижению уровня мРНК и/или белка tau МАРТ.

Химические модификации могут быть включены в стерические блокаторы для повышения стабильности, эффективности и/или поглощения клетками. Стерические блокаторы могут иметь химическую модификацию в каждом положении нуклеотида или в некоторых выбранных положениях. Так, например,

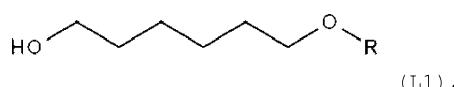
введение 2'-модификации сахарного кольца (такой как 2'-О-метоксиэтил, МОЕ), включение блокированной нуклеиновой кислоты (LNA) и/или модификации остова (такого как фосфортиоатный остов) может снижать расщепление нуклеазой и/или повышать аффинность связывания антисмысловых олигонуклеотидов. Стерические блокаторы, кроме модификаций сахара и/или остова, могут состоять из олигомеров, которые значительно отличаются от ДНК или РНК. Пептидсодержащая нуклеиновая кислота (PNA) представляет собой олигонуклеотид-миметик, в котором нуклеотидные основания связаны амидными связями. Поскольку амидный остов является незаряженным, то связывание характеризуется высокими уровнями ассоциации и высокой аффинностью (см. Bentin T., Biochemistry. 1996; 35:8863-8869; Smullevitch S.V., Nat. Biotech. 1996; 14:1700-1704). Другим незаряженным аналогом ДНК являются фосфордиамидатные морфолино-олигомеры (обычно называемые "РМО или морфолинами"). РМО не способны комплементарно связываться с мишенью с высокой аффинностью, которая характеризует связывание с PNA, но оказалось, что они являются эффективными агентами внутри клеток (см. Summerton J., Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1997; 7:187-195; Corey D.R., Genome Biol. 2001; 2:REVIEWS1015).

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, представляют собой стерические блокаторы, содержащие 2'-модифицированные нуклеотиды. 2'-Модификация может быть выбрана из группы, состоящей из 2'-фтора, 2'-дезокси-2'-фтора, 2'-О-метила, 2'-О-метоксиэтила (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропила (2'-О-АР), 2'-О-диметиламиноэтила (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропила (2'-О-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-О-DMAEОЕ) и 2'-О-N-метилацетамида (2'-О-NMA). В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, представляют собой стерические блокаторы, которые имеют 2'-О-МОЕ-модификацию в каждой нуклеотидной субъединице.

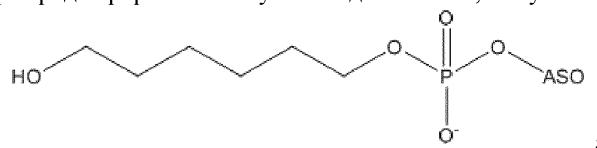
В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, представляют собой стерические блокаторы, которые имеют межнуклеозидные фосфодиэфирные или фосфортиоатные связи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, представляют собой стерические блокаторы, которые содержат модификации остова, препятствующие связыванию с РНКазой Н. Такие стерические блокаторы могут включать модифицированные межнуклеозидные связи, например метилfosfonатную связь, метилfosfonотиоатную связь, фосформорфолидатную связь, фосфорпиперазидатную связь или фосфорамидитную связь. В некоторых вариантах осуществления каждая другая межнуклеозидная связь может содержать модифицированный фосфат с 2'-низшей алкильной группой (такой как, например, C₁-C₄, прямой или разветвленный насыщенный или ненасыщенный алкил, такой как метил, этил, этенил, пропил, 1-пропенил, 2-пропенил и изопропил) или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, представляют собой стерические блокаторы, которые включают одну или более модифицированных межнуклеозидных связей, описанных в патенте США № 5149797.

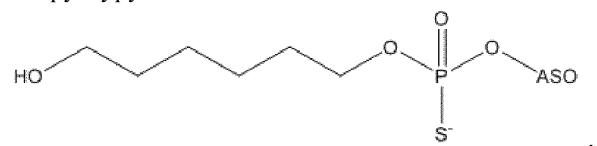
В некоторых вариантах осуществления описанные здесь стерические блокаторы, нацеленные на МАРТ, включают С6-линкер у 3'-конца со следующей структурой:



которая присоединена к 3'-концу олигонуклеотида посредством фосфатного мостика, где R=PO₂-O-олигонуклеотид (для фосфодиэфирных межнуклеозидных связей) или R=POS-O-олигонуклеотид (для фосфортиоатных межнуклеозидных связей). В соответствии с этим стерические блокаторы, нацеленные на МАРТ и включающие фосфодиэфирные межнуклеозидные связи, могут иметь следующую структуру:



а стерические блокаторы, нацеленные на МАРТ и включающие фосфортиоатные межнуклеозидные связи, могут иметь следующую структуру:



Гапмеры.

Антисмыловые олигонуклеотиды, содержащие непрерывный фрагмент ДНК, могут осуществлять рекрутинг клеточной эндонуклеазы РНКазы Н к целевому гетеродуплексу РНК:ДНК и расщеплять РНК-мишень в дуплексе РНК:ДНК. Гапмеры представляют собой химерные антисмыловые соединения. Хи-

мерные антисмыловые соединения обычно содержат по меньшей мере одну область, модифицированную так, чтобы она сообщала повышенную резистентность к разложению нуклеазой, повышенный уровень поглощения клетками, повышенную аффинность связывания с нукleinовой кислотой-мишенью и/или повышенную ингибирующую активность, и вторую область, имеющую нуклеотиды, которые химически отличаются от нуклеотидов первой области.

Гапмеры имеют центральный гэп-сегмент, состоящий из фрагмента смежных 2'-дезоксирибонуклеотидов, расположенных между двумя сегментами крыла, состоящими из модифицированных нуклеотидов у 5'- и 3'-концов. Гэп-сегмент служит в качестве субстрата для расщепления эндо-нуклеазой РНКазой Н, а сегменты крыла с модифицированными нуклеотидами сообщают повышенную резистентность к расщеплению другой нуклеазой. Сегмент "крыло-гэп-крыло" может быть обозначен как "X-Y-Z", где "X" означает длину 5'-крыла, "Y" означает длину гэпа, а "Z" означает длину 3'-крыла. "X" и "Z" могут включать одинаковые, различные или чередующиеся сахарные группы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения центральный гэп-сегмент гапмера состоит по меньшей мере из пяти (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) смежных 2'-дезоксирибонуклеотидов, а сегменты 5'- и 3'-крыльев содержат один или более 2'-модифицированных нуклеотидов. Сообщалось, что химерный олигонуклеотид, содержащий фрагмент от одного до четырех смежных 2'-дезоксирибонуклеотидов, не активирует РНКазу Н. См. патент США № 9157081. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, представляют собой гапмеры, содержащие по меньшей мере семь (например, 7, 8, 9, 10, 11, 12) смежных 2'-дезоксирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, представляют собой гапмеры, содержащие десять смежных 2'-дезоксирибонуклеотидов. 2'-Модификация может быть выбрана из группы, состоящей из 2'-фтора, 2'-дезокси-2'-фтора, 2'-О-метила, 2'-О-метоксиэтила (2'-О-MOE), 2'-О-аминопропила (2'-О-AP), 2'-О-диметиламиноэтила (2'-O-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропила (2'-O-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-O-DMAE0E) и 2'-О-N-метилацетамида (2'-O-NMA).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гапмеры, нацеленные на МАРТ, представляют собой 5-10-5-гапмеры длиной 20 нуклеозидов, где центральный гэп-сегмент содержит десять 2'-дезоксинуклеозидов и фланкирован сегментами 5'- и 3'-крыла, каждый из которых содержит пять нуклеозидов с 2'-модификацией. Другими подходящими гапмерами являются, но не ограничиваются ими, 5-9-5-гапмеры, 5-8-5-гапмеры, 4-8-6-гапмеры, 6-8-4-гапмеры или 5-7-6-гапмеры.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, представляют собой гапмеры, например олигонуклеотиды, содержащие последовательность нуклеотидных оснований, которая по меньшей мере на 70% (например, на 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%) идентична любым последовательностям, представленным в табл. 9-15 и 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, представляют собой гапмеры, которые содержат любые последовательности нуклеотидных оснований, представленные в табл. 9-15 и 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, представляют собой гапмеры, которые состоят из любых последовательностей нуклеотидных оснований, представленных в табл. 9-15 и 17. Как подробно описано ниже в примерах, гапмеры были сконструированы так, чтобы они были нацелены на последовательности, окружающие стар-кодон, экзон 1 или 3'-нетранслируемую область (UTR) транскрипта МАРТ. В некоторых вариантах осуществления изобретения гапмеры были сконструированы так, чтобы они были нацелены на 3'-UTR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, представляют собой 5-10-5-гапмеры, которые содержат любые последовательности нуклеотидных оснований, представленные в табл. 9-15 и 17, где каждый 1-5 нуклеотид содержит 2'-О-MOE-модифицированный нуклеозид, каждый 6-15 нуклеотид содержит 2'-дезоксинуклеозид, а каждый 16-20 нуклеотид содержит 2'-О-MOE-модифицированный нуклеозид.

Геномные последовательности МАРТ, на которые нацелены антисмыловые олигонуклеотиды.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловые олигонуклеотиды были сконструированы так, чтобы они были нацелены на конкретную область геномной последовательности МАРТ (GenBank, рег. № NG_007398.1 (SEQ ID NO: 304) или область соответствующей мРНК или транскрипта tau (SEQ ID NO: 306). Последовательности инtronов и экзонов МАРТ и точки ветвления были определены исходя из базы данных геномов Ensembl на web-сайте с использованием программы Transcript: МАРТ-203 ENST00000344290. Скрининг экзонов, инtronов и стыков инtron/экзон человеческого гена МАРТ показал, что нацеливание на некоторые области в гене или транскрипте МАРТ с помощью антисмыловых олигонуклеотидов является более эффективным для снижения уровня экспрессии tau, чем нацеливание на другие области. Так, например, в табл. 1 перечислены последовательности некоторых предпочтительных областей в гене или транскрипте МАРТ, которые могут быть мишениями для антисмыловых олигонуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды содержат последовательность нуклеотидных оснований, которая является комплементарной по

меньшей мере 12 смежным нуклеотидным основаниям (например, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 смежным нуклеотидным основаниям) любой из SEQ ID NO: 487-506, с 1, 2 или 3 несоответствиями. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды содержат последовательность нуклеотидных оснований, которая на 100% комплементарна по меньшей мере 12 смежным нуклеотидным основаниям (например, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 смежным нуклеотидным основаниям) любой из SEQ ID NO: 487-506.

Таблица 1

**Выбранные геномные последовательности МАРТ, мРНК или пре-мРНК,
на которые нацелены антисмыловые олигонуклеотиды tau**

| Выбранные геномные последовательности МАРТ (антисмыловая цепь), на которые нацелены ASO tau | SEQ ID NO | Локализация | Соответствующая последовательность мРНК или пре-мРНК МАРТ, на которую нацелены ASO tau |
|--|------------------|----------------------|---|
| ACGCTGGCCTGAAAGGTTAGTGGAC | 292 | Стык инtron/экзон 1 | GUCCACUAACCUUCAGGCCAGCGU (SEQ ID NO: 503) |
| AAAAGCCAAGGTAAGCTGACGATGC | 293 | Стык инtron/экзон 5 | GCAUCGUCAGCUUACCUUGGCCUUU (SEQ ID NO: 504) |
| TTTTATATTTTATCAGCTCGCATGG | 294 | Стык инtron/экзон 5 | CCAUGCGAGCUGAUAAAUAUAAA (SEQ ID NO: 505) |
| ACCCACAAGCTGACCTTCG | 295 | Экзон 13 | CGGAAGGUAGCUUGUGGGU (SEQ ID NO: 487) |
| ACCGAGCTGAAGAAGCAGGCATTGGAGA CAC | 296 | Экзон 4 | GUGUCUCCAAUGCUGCUUCUUCAGCUG GU (SEQ ID NO: 488) |
| CTCTCATCTCAGGTGCAAATAGTC | 297 | Стык инtron/экзон 11 | GACUAUUUGCACCUUGGAGAUGAGAG (SEQ ID NO: 506) |
| ATAGTCTACAAACCAGTTGA | 298 | Экзон 11 | UCAACUGGUUGUAGACUAU (SEQ ID NO: 489) |
| ATTAGGCAACATCCATCATA | 299 | Экзон 11 | UAUGAUGGAUGUUGCCUAAU (SEQ ID NO: 490) |
| GAACCAGGATGGCTGAGCCC | 300 | Экзон 1 | GGGCUCAGCCAUCUGGUUC (SEQ ID NO: 491) |
| CGTCCCTGGCGGAGGAAA | 301 | Экзон 12 | UUUCCUCGCCAGGGACG (SEQ ID NO: 492) |
| TGGTCAGTAAAGCAAAGAC | 302 | Экзон 5 | GUCUUUGCUUUUACUGACCA (SEQ ID NO: 493) |
| CTGGAAGCGATGACAAAAAA | 303 | Экзон 5 | UUUUUUGUCAUCGCUUCCAG (SEQ ID NO: 494) |
| CCTTGCTCAGGTCAACTGGT | 479 | Экзон 12 | ACCAGUUGACCUGAGCAAGG (SEQ ID NO: 495) |
| GGTTGACATCGTCTGCCTGT | 480 | 3'UTR | ACAGGCAGACGAUGUCAACC (SEQ ID NO: 496) |
| GTCCCCACTCTTGTGCCTGGA | 481 | 3'UTR | UCCAGGCCACAAGAGUGGGAC (SEQ ID NO: 497) |
| GACATCGTCTGCCTGTGGCT | 482 | 3'UTR | AGCCACAGGCAGACGAUGUC (SEQ ID NO: 498) |
| CCCACTCTTGTGCCTGGACT | 483 | 3'UTR | AGUCCAGGCCACAAGAGUGGG (SEQ ID NO: 499) |
| GTCCCCAGGTCTGCAAAGTGG | 484 | 3'UTR | CCACUUUGCAGACCUGGGAC (SEQ ID NO: 500) |
| GTCTGCCTGTGGCTCCACGA | 485 | 3'UTR | UCGUGGAGGCCACAGGCAGAC (SEQ ID NO: 501) |
| AGTCACTCTGGTGAATCCAA | 486 | 3'UTR | UUGGAUUCACCAGAGUGACU (SEQ ID NO: 502) |

Конъюгаты антисмыловых олигонуклеотидов.

Конъюгирование антисмыловых олигонуклеотидов с другой молекулой может повышать активность, поглощение клетками и/или распределение в тканях антисмыловых олигонуклеотидов. Так, например, антисмыловые олигонуклеотиды могут быть ковалентно связаны с одним или более диагностическими соединениями, репортерной группой, перекрестно-сшивающим агентом, молекулой, сообщающей резистентность к нукlease, липофильной молекулой, холестерином, липидом, лектином, линкером, стероидом, увалом, гецигенином, диосгенином, терпеном, тритерпеном, сарсасапогенином, фриделином, лихохолевой кислотой, дериватизированной эпифриделанолом, витамином, биотином, углеводом, дексстраном, красителем, пуллуланом, хитином, хитозаном, синтетическим углеводом, 15-мерным олиголактатом, природным полимером, полимером с низкой или средней молекулярной массой, инулином, циклодекстрином, гиалуроновой кислотой, белком, белок-связывающим агентом, молекулой, нацеленной на интегрин, поликатионом, пептидом, полиамином, пептидомиметиком, трансферином, кумаринами, феназином, фолатом, фенантридином, антрахиноном, акридином, флуоресцеинами и/или родаминами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды связаны с линкерной молекулой. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды связаны с липидом или холестерином. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловые олигонуклеотиды связаны с нейтральными липосомами (NL) или липидными наночастицами (LNP). LNP представляют собой самособирающиеся системы на основе катионных липидов, которые могут содержать, например, нейтральный липид (липосомное основание); катионный липид (для загрузки олигонуклеотида); холестерин (для стабилизации липосом) и ПЭГ-липид (для стабилизации композиции, сохранения заряда и увеличения его циркуляции в кровотоке). Нейтральные липосомы (NL) представляют собой частицы на основе некационных липидов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды связаны с жирной кислотой, например с жирной кислотой омега-3 или с жирной кислотой омега-6. Подходящими жирными кислотами омега-3 являются, например, α -линоленовая кислота (ALA), докозагексаеновая кислота (DHA), эйкозапентаеновая кислота (EPA), докозапентаеновая кислота (DPA), эйкозатетраеновая кислота (ETA), эйкозатриеновая кислота (ETE), эйкозапентаеновая кислота (EPA), гексадекатриеновая кислота (HTA), генеикозапентаеновая кислота (HPA), стеаридоновая кислота (SDA), тетракозапентаеновая кислота и тетракозагексаеновая кислота.

Тестирование активности антисмыловых олигонуклеотидов.

Активность антисмыловых олигонуклеотидов может быть протестирована *in vitro* или *in vivo*. Для тестирования *in vitro* ASO могут быть введены в культивируемые клетки путем трансфекции или электропорации. После обработки может быть определен уровень экспрессии МАРТ (tau) в ASO-обработанных клетках с последующим сравнением этого уровня с уровнем экспрессии МАРТ (tau) в необработанных контрольных клетках.

Уровень экспрессии МАРТ может быть определен любым подходящим методом, например путем количественного определения уровня мРНК МАРТ, путем измерения количества cDNA , полученной посредством обратной транскрипции мРНК МАРТ, или путем определения количества белка tau. Эти методы могут быть осуществлены на образце методом выборки или методом, модифицированным для крупномасштабного анализа.

Уровень мРНК МАРТ может быть детектирован и количественно оценен с помощью зонда, который специфически гибридизуется с сегментом транскрипта МАРТ, например, с помощью Нозерн-блот-анализа. Уровень мРНК МАРТ может быть также определен и количественно оценен с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием пары праймеров, которые распознают транскрипт МАРТ. Общие процедуры для ПЦР описаны MacPherson et al., PCR: A Practical Approach, (IRL Press at Oxford University Press (1991)). Однако условия ПЦР, используемые для каждой проводимой реакции, определяют эмпирически. На успех реакции влияет ряд параметров, например температура и время отжига, время удлинения, концентрация Mg^{2+} и/или АТФ, pH и относительная концентрация праймеров, матриц и/или дезоксирибонуклеотидов. После амплификации полученные фрагменты ДНК могут быть детектированы с помощью электрофореза в агарозном геле с последующей визуализацией путем окрашивания этидиембронидом и облучения ультрафиолетом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень мРНК МАРТ может быть детектирован и количественно оценен с помощью количественной ПЦР в реальном времени, которая осуществляет мониторинг амплификации нуклеиновой кислоты-мишени посредством одновременного включения детектируемого красителя или репортера во время стадии амплификации с использованием любой коммерчески доступной ПЦР-системы в реальном времени.

Альтернативно, метка может быть присоединена непосредственно к исходному образцу нуклеиновой кислоты (например, мРНК, поли-А, мРНК, cDNA и т.п.) или к продукту амплификации после завершения амплификации. Методы присоединения меток к нуклеиновым кислотам хорошо известны специалистам и включают, например, ник-трансляцию или мечение по концам (например, меченной РНК) путем обработки нуклеиновой кислоты киназой и последующего присоединения (лигирования) нуклеиново-вокислотного линкера, связывающего образец нуклеиновой кислоты с меткой (например, флуорофором).

Детектируемые метки, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают любую композицию, детектируемую спектроскопическими, фотохимическими, биохимическими, иммунохимическими, электрическими, оптическими или химическими средствами. Подходящими метками согласно изобретению являются биотин для окрашивания меченых конъюгатом стрептавидина, магнитные сферы (например, Dynabeads™), флуоресцентные красители (например, флуоресцеин, техасский красный, родамин, зеленый флуоресцентный белок и т.п.), радиоактивные метки (например, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C или ^{32}P), ферменты (например, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и другие ферменты, обычно используемые в ELISA) и колориметрические метки, такие как коллоидное золото или цветное стекло или пластиковые сферы (например, полистирол, полипропилен, латекс и т.п.). Патентами, в которых описано использование таких меток, являются патенты США №№ 3817837; 3850752; 3939350; 3996345; 4277437; 4275149 и 4366241.

Детектирование меток хорошо известно специалистам в данной области. Так, например, радиоактивные метки могут быть детектированы с использованием фотографической пленки или сцинтиляционных счетчиков, а флуоресцентные маркеры могут быть детектированы с использованием фотодетектора для обнаружения излучаемого света. Ферментные метки обычно детектируются посредством обработки фермента субстратом и детектирования продукта реакции, продуцируемого под действием фермента на субстрате, а колориметрические метки детектируются просто путем визуализации окрашенной метки. Подробное описание методов мечения нуклеиновых кислот и детектирования меченых гибридизованных нуклеиновых кислот можно найти в руководстве *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 24: *Hybridization with Nucleic Acid Probes*, P. Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

Активность антисмыловых олигонуклеотидов может быть также оценена путем измерения уровней белка tau известными методами. Так, например, уровень белка tau может быть количественно оценен с помощью Вестерн-блот-анализа (иммуноблоттинга), твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), иммуногистохимического анализа, иммуноанализов, иммунопреципитации, иммунофлуоресцентных анализов, иммуноцитохимических анализов, клеточного сортинга с активацией флуоресценции (FACS), радиоиммуноанализов, иммунорадиометрических анализов, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), масс-спектрометрии, конфокальной микроскопии, ферментативных анализов или поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

In vivo активность антисмыловых олигонуклеотидов может быть также протестирана на животных-моделях. Тестирование может быть осуществлено на нормальных животных или на животных с экспериментальной моделью заболевания. Антисмыловые олигонуклеотиды могут быть получены в фармацевтически приемлемом разбавителе и доставлены подходящим способом введения. После лечения могут быть взяты образцы ткани, например ткань головного мозга, цереброспинальная жидкость (CSF), спинной мозг, а затем может быть определен уровень экспрессии tau любыми вышеописанными методами. Для оценки структуры головного мозга и/или для детектирования присутствия нейрофибрillaryных клубков может быть проведен гистологический анализ. Может быть также проведен мониторинг и анализ фенотипических изменений у обработанных животных, таких как улучшение познавательной способности или подвижности.

Синтез и характеристика олигонуклеотидов.

Одноцепочные олигонуклеотиды могут быть синтезированы любыми методами полимеризации нуклеиновых кислот, известными специалистам, например, с помощью твердофазного синтеза с применением фосфорамидитной методики (S.L. Beaucage and R.P. Iyer, *Tetrahedron*, 1993, 49, 6123; S.L. Beaucage and R.P. Iyer, *Tetrahedron*, 1992, 48, 2223), Н-фосфонатов, фосфотриэфирной химии или ферментативного синтеза. При этом могут быть использованы автоматизированные коммерчески доступные синтезаторы, например синтезаторы от BioAutomation (Irving, Texas), или Applied Biosystems (Foster City, California). В некоторых вариантах осуществления изобретения одноцепочные олигонуклеотиды получают с использованием стандартных твердофазных фосфорамидитных химических методов, например, описанных в *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA. Фосфотиоатные связи могут быть введены с использованием сульфирующего реагента, такого как фенилацетилдисульфид или DDTT (((диметиламинометилиден)амино)-3Н-1,2,4-дитиазолин-3-тион). Хорошо известно применение аналогичных методов и коммерчески доступных модифицированных амидитов и стекла с регулируемым размером пор (CPG), таких как амидиты, модифицированные биотином, флуоресцеином, акридином или псоралином, и/или CPG для синтеза модифицированных олигонуклеотидов или флуоресцентно меченых олигонуклеотидов, конъюгированных с биотином, или других конъюгированных олигонуклеотидов.

Для минимизации уровней примесей в конечном продукте необходим контроль качества исходных материалов и продуктов после каждой стадии синтеза. Однако учитывая число стадий синтеза на одно связывание и число связываний, наличие примесей будет неизбежным. Методы очистки могут быть применены для удаления нежелательных примесей из конечного олигонуклеотидного продукта. Обычно применяемыми методами очистки одноцепочных олигонуклеотидов являются обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография ионных пар (ОФ-ИП-ВЭЖХ), электрофорез в капиллярном геле (ЭКГ), анионообменная ВЭЖХ (АО-ВЭЖХ) и эксклюзионная хроматография (ЭХ).

После очистки олигонуклеотиды могут быть проанализированы с помощью масс-спектрометрии и количественно оценены на спектрофотометре на длине волны 260 нм.

Терапевтическое применение и способы лечения.

Настоящее изобретение относится к способам снижения уровня экспрессии tau у индивидуума, например у человека, путем введения указанному индивидууму терапевтически эффективного количества любых описанных здесь антисмыловых олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмыловой олигонуклеотид может быть введен индивидууму интратекально, интракраниально, интраназально, внутривенно, перорально или подкожно. В некоторых вариантах осуществления изобретения такие способы также включают идентификацию и отбор индивидуума, страдающего тау-ассоциированным заболеванием или восприимчивого к этому заболеванию.

Описанные здесь антисмыловые олигонуклеотиды или фармацевтические композиции на их основе могут быть использованы для лечения или профилактики тау-ассоциированного заболевания у индивидуума. В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к описанным здесь антисмыловым олигонуклеотидам или к фармацевтическим композициям на их основе для применения в лечении или в профилактике тау-ассоциированного заболевания у пациента. В других своих вариантах настоящее изобретение относится к применению описанных здесь антисмыловых олигонуклеотидов в целях приготовления лекарственного средства для применения в лечении или в профилактике тау-ассоциированного заболевания у пациента.

Тау-ассоциированными заболеваниями являются, но не ограничиваются ими, болезнь Альцгеймера (БА), амиотрофический боковой склероз/комплекс паркинсонизм-деменция (АБС-КПД), деменция в области аргирофильных зерен (ДАГЗ), амилоидная ангиопатия британского типа, церебральная амилоидная ангиопатия, хроническая травматическая энцефалопатия (ХТЭ), кортико базальная дегенерация (КБД), болезнь Крейффельда-Якоба (БКЯ), деменция боксеров, диффузные повреждения нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, синдром Дауна, синдром Дравета, эпилепсия, деменция в области лобно-височной доли (ДЛВД), деменция в области лобно-височной доли, ассоциированная с паркинсонизмом, сцепленным с хромосомой 17 (FTDP-17), дегенерация передней лобно-височной доли, ганглиоглиома, ганглиоцитома, болезнь Герстманна-Штраусслера-Шейнкера, болезнь Галервортена-Шпатца, болезнь Гентингтона, миозит, вызываемый тельцами включения, энцефалопатия, вызываемая свинцом, болезнь Литико-Бодига, менингиоангиоматоз, атрофия многих органов, миотоническая дистрофия, болезнь Нимана-Пика типа С (НП-С), негваманиеовое заболевание двигательных нейронов, ассоциированное с поражением нейрофибриллярных клубков, болезнь Пика (БП), постэнцефалитный паркинсонизм, церебральная амилоидная ангиопатия, вызываемая белками прионами, прогрессирующий субкортикальный глиоз, прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП), подострый склерозирующий панэнцефалит, деменция, поражающая только область клубков, деменция, преобладающая в области клубков, мультиинфарктная деменция, ишемический инсульт и клубневой склероз.

Комбинированная терапия.

Различные описанные выше олигонуклеотиды могут быть использованы в комбинации с другими лекарственными средствами. В соответствии с этим способы лечения описанного здесь тау-ассоциированного заболевания могут также включать введение второго агента индивидууму, нуждающемуся в лечении. Так, например, антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на ассоциированный с микротрубочками белок tau (МАРТ), могут быть использованы в комбинации с антителом, которое специфически связывается с белком tau и/или с агентом, нацеленным на амилоид бета (A β), например, с антителом, которое связывается с A β или с ингибитором β -секретазы (ВАСЕ). В некоторых вариантах осуществления антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, используются в комбинации с антителом, которое специфически связывается с белком tau. В некоторых вариантах осуществления антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, используются в комбинации с ингибитором ВАСЕ.

Термин "комбинация" означает фиксированную комбинацию в виде одной унифицированной лекарственной формы или комбинированное введение, где соединение согласно изобретению и другой компонент этой комбинации (например, другое лекарственное средство, описанное ниже и также называемое "терапевтическим средством" или "совместно вводимым агентом") могут быть введены независимо друг от друга в одно и то же время или по отдельности в различные интервалы времени, особенно в те интервалы времени, когда эти компоненты комбинации дают суммарный, например синергический эффект. Отдельные компоненты могут быть упакованы в виде набора или использованы по отдельности. Один или оба этих компонента (например, порошки или жидкости) могут быть разведены или разбавлены до нужной дозы перед введением. Используемые здесь термины "совместное введение" или "комбинированное введение" или т.п. означают введение выбранного компонента комбинации индивидууму, нуждающемуся в этом (например, пациенту), и включают схемы лечения, в которых агенты необязательно вводят одним и тем же способом или в одно и то же время. Используемый здесь термин "фармацевтическая комбинация" означает продукт, полученный путем смешивания или объединения более чем одного терапевтического средства, и включает фиксированные и нефиксированные комбинации терапевтиче-

ских средств. Термин "фиксированная комбинация" означает, что терапевтические средства, например олигонуклеотид согласно изобретению и другой компонент этой комбинации, вводят пациенту одновременно в форме единого целого или дозы. Термин "нефиксированная комбинация" означает, что терапевтические средства, например олигонуклеотид согласно изобретению и другой компонент этой комбинации, вводят пациенту в виде отдельных единиц, либо одновременно, либо параллельно, либо последовательно без каких-либо конкретных временных ограничений, где такое введение обеспечивает терапевтически эффективные уровни двух соединений в организме пациента. Последнее также относится к комбинированному лечению, например, путем введения трех или более терапевтических средств.

Используемый здесь термин "фармацевтическая комбинация" означает либо фиксированную комбинацию в виде одной унифицированной лекарственной формы, либо нефиксированную комбинацию, либо набор частей для комбинированного введения, где два или более терапевтических средств могут быть введены независимо друг от друга в одно и то же время или по отдельности в различные интервалы времени, особенно в те интервалы времени, когда эти компоненты комбинации дают суммарный, например синергический, эффект.

Термин "комбинированная терапия" означает введение двух или более терапевтических средств для лечения терапевтического состояния или расстройства, описанного в настоящей заявке. Такое введение включает совместное введение этих терапевтических средств, по существу, одновременно, например, в одной капсуле, имеющей фиксированное отношение активных ингредиентов. Альтернативно, такое введение включает совместное введение каждого активного ингредиента в контейнерах для многократных доз или в отдельных лекарственных формах (например, в виде таблеток, капсул, порошков и жидкостей). Порошки и/или жидкости могут быть перед их введением разведены или разбавлены до получения нужной дозы. Кроме того, такое введение также включает применение терапевтического средства каждого типа в последовательном порядке, либо приблизительно в одно и то же время, либо в различные периоды времени. В любом случае, схема лечения будет оказывать благотворное действие комбинации лекарственных средств в лечении состояний или расстройств, описанных в настоящей заявке.

Приготовление образцов.

Образцы ткани могут быть получены от индивидуума, которому был введен антисмысловой олигонуклеотид любыми известными методами, например, с помощью биопсии или хирургической операции. Так, например, образец, содержащий цереброспиннальную жидкость, может быть получен путем люмбальной пункции, при которой тонкая игла, прикрепленная к шприцу, вставляется в спинно-мозговой канал в области поясницы, и таким образом создается вакуум, в результате чего цереброспиннальная жидкость может всасываться через иглу и собираться в шприц. Мониторинг процедуры этого типа может быть проведен с помощью КТ, ультразвука или на эндоскопе.

Образец может быть подвергнут быстрому замораживанию и положен на хранение при -80°C для последующего использования. Образец может быть также фиксирован с помощью фиксатора, такого как формальдегид, параформальдегид или уксусная кислота/этанол. РНК или белок могут быть экстрагированы из свежего, замороженного или фиксированного образца для анализа.

Фармацевтические композиции, дозы и введение.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к описанным здесь композициям, например фармацевтическим композициям, содержащим один или более описанных здесь антисмысловых олигонуклеотидов. Фармацевтические композиции обычно включают фармацевтически приемлемый носитель.

Используемый здесь термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает физиологический раствор, растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию и т.п., подходящие для введения фармацевтического средства.

Фармацевтические композиции обычно приготавливают так, чтобы они были совместимы с предполагаемым способом введения. Примерами способов введения являются интратекальное, внутричерепное, интраназальное, внутривенное, пероральное или подкожное введение.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный здесь антисмысловой олигонуклеотид может быть конъюгирован с антителом, способным пересекать гематоэнцефалический барьер (например, с антителом, которое связывается с рецептором трансферина, инсулином, лептином или инсулиноподобным фактором роста 1), и может быть введен внутривенно (Evers et al., Advanced Drug Delivery Reviews 87 (2015): 90-103).

Способы приготовления подходящих фармацевтических композиций известны специалистам, см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 21st ed., 2005; and the books in the series Drugs and the Pharmaceutical Sciences: a Series of Textbooks and Monographs (Dekker, NY). Так, например, растворы или суспензии, используемые для парентерального, интрадермального, интратекального или подкожного введения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, жирные масла, полизиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатообразующие агенты, такие как этилендиаминетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или

фосфаты, и агенты для придания тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. pH может быть скорректирован с использованием кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы с многократными дозами, изготовленные из стекла или пластика.

Фармацевтические композиции, подходящие для применения в виде инъекций, могут включать стерильные водные растворы (водорастворимые) или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления препарата в виде стерильных инъецируемых растворов или дисперсий. Для внутривенного введения подходящими носителями являются физиологический раствор, бактериостатическая вода, Степорилор EL™ (BASF, Parsippany, NJ) или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и жидкой до такой степени, чтобы ее легко можно было забрать в шприц. Она должна быть стабильной в условиях приготовления и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Текущесть может поддерживаться, например, за счет покрытия, такого как лецитин, путем сохранения требуемого размера частиц в случае дисперсии и использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, таких как, например, парабены, хлорбутанол, фенол, аскорбиновая кислота, тимерозал и т.п. Во многих случаях в композицию предпочтительно включать изотонические агенты, например, сахара; многоатомные спирты, такие как маннит и сорбит; и хлорид натрия. Пролонгированное поглощение инъецируемых композиций может быть достигнуто путем включения в композицию агента, замедляющего поглощение, например моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные инъецируемые растворы могут быть приготовлены путем введения активного соединения в нужном количестве в соответствующем растворителе вместе с одним из перечисленных выше ингредиентов или их комбинацией, если это необходимо, с последующей стерилизацией на фильтре.

Обычно дисперсии приготавливают путем введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из тех, которые были перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъецируемых растворов, предпочтительными методами приготовления являются вакуумная сушка и сушка вымораживанием с получением порошка, содержащего активный ингредиент плюс любой дополнительный нужный ингредиент из предварительно стерилизованного на фильтре раствора.

Композиции для перорального введения обычно включают инертный разбавитель или пищевой носитель. Для перорального терапевтического введения активное соединение может быть включено вместе с эксципиентами и использовано в форме таблеток, пастилок или капсул, например желатиновых капсул. Композиции для перорального введения могут быть также приготовлены с использованием жидкого носителя в виде жидкости для полоскания рта. Фармацевтически приемлемые связывающие агенты и/или адьюванты могут быть включены как часть композиции. Таблетки, драже, капсулы, пастилки и т.п. могут содержать любые из следующих ингредиентов или соединения аналогичной природы: связующее вещество, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; наполнитель, такой как крахмал или лактоза; дезинтегрирующий агент, такой как альгиновая кислота; примогель или кукурузный крахмал; лубрикант, такой как стеарат магния или Sterotes; вещество, увеличивающее скольжение, такое как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин; или ароматизатор, такой как перечная мята, метилсалцилат или апельсиновая отдушка.

Для введения путем ингаляции соединения могут быть доставлены в форме аэрозольного спрея из находящегося под давлением контейнера или дозатора, который содержит подходящий пропеллент, например газ, такой как диоксид углерода, или распылителя. Такие способы включают способы, описанные в патенте США № 6468798. Системное введение описанного здесь терапевтического соединения может быть также осуществлено через слизистую или через кожу. Для введения через слизистую или для трансдермального введения, в препарат вводят пенетранты, способные проникать через соответствующий барьер. Такие пенетранты, по существу, известны специалистам, и включают, например, детергенты, соли желчных кислот и производные фузидиновой кислоты для введения через слизистую. Введение через слизистую может быть осуществлено с помощью интраназальных спреев или суппозиториев. Для трансдермального введения, активные соединения приготавливают в виде жидких мазей, твердых мазей, гелей или кремов методами, по существу, известными специалистам.

В одном варианте осуществления изобретения терапевтические соединения приготавливают вместе с носителями, которые будут защищать терапевтические соединения от быстрого выведения из организма, например, в виде композиции с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки.

Фармацевтические композиции могут быть включены в контейнер, упаковку или в раздаточное устройство вместе с инструкцией по применению.

В неограничивающих примерах фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере один фармацевтический агент, приготавливают в виде жидкости (например, термореактивной жидкости)

в качестве компонента твердого вещества (например, порошка или биологически разлагаемого биосовместимого полимера (например, катионного биоразлагаемого биосовместимого полимера)), или в качестве компонента геля (например, биоразлагаемого биосовместимого полимера). В некоторых вариантах осуществления изобретения композицию, содержащую по меньшей мере одно фармацевтическое средство, приготавливают в виде геля, выбранного из группы, состоящей из геля альгината (например, альгината натрия), геля на основе целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлозы или карбоксиэтилцеллюлозы) или геля на основе хитозана (например, глицерофосфата хитозана). Кроме того, неограничивающими примерами полимеров, элюирующихся из лекарственного средства, которые могут быть использованы для приготовления любых описанных здесь фармацевтических композиций, являются карагenan, карбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, декстран в комбинации с поливиниловым спиртом, декстран в комбинации с полиакриловой кислотой, полигалактуроновая кислота, галактуроновый полисахарид, полисалактиновая кислота, полигликоловая кислота, камедь тамаринда, ксантановая камедь, целлюлозная камедь, гуаровая камедь (карбоксиметилгуар), пектин, полиакриловая кислота, полиметакриловая кислота, N-изопропилполиакриламид, полиоксиэтилен, полиоксипропилен, плuronовая кислота, полимолочная кислота, циклодекстрин, циклоамилоза, резилин, полибутиадиен, сополимер N-(2-гидроксипропил)метакриламида (HP MA), ангидрат малеиновой кислоты-алкилвиниловый эфир, полидепептид, полигидроксибутират, поликаролактон, полидиоксанон, полиэтиленгликоль, полиорганофосфазен, сложный полиортогоэфир, поливинилпирролидон, сополимер молочной и гликоловой кислоты (PLGA), полиангидриды, полисиламин, поли-N-винилкарболактам и геллан.

В некоторых вариантах осуществления изобретения доставка антисмыслового олигонуклеотида в ткань-мишень может быть улучшена за счет доставки, опосредуемой носителем, включая, но не ограничиваясь ими, катионные липосомы, циклодекстрины, производные порфирина, дендримеры с разветвленной цепью, полиэтилениминовые полимеры, наночастицы и микросфера (Dass C.R. J. Pharm. Pharmacal. 2002; 54(1):3-27).

Термин "эффективное количество" означает количество, достаточное для достижения полезных или желаемых результатов. Так, например, терапевтическим количеством является количество, обеспечивающее желаемый терапевтический эффект. Это количество может быть таким же, как профилактически эффективное количество, или оно может отличаться от этого количества, и такое количество является необходимым для предотвращения начала развития заболевания или его симптомов. Эффективное количество может быть введено за одну или более инъекций, нанесений или доз. Терапевтически эффективное количество терапевтического соединения (т.е. эффективная доза) зависит от выбранных терапевтических соединений. Композиции могут быть введены от одного или более раз в день до одного или более раз в неделю; включая один раз в день. Специалисту в данной области очевидно, что доза и время, необходимые для эффективного лечения индивидуума, могут зависеть от ряда факторов, включая, но не ограничиваясь ими, тяжесть заболевания или расстройства, предшествующее лечение, общее состояние здоровья и/или возраст индивидуума и другие заболевания. Кроме того, лечение индивидуума терапевтически эффективным количеством описанных здесь терапевтических соединений может включать один курс лечения или повторные курсы лечения.

Дозы, токсичность и терапевтическая эффективность терапевтических соединений могут быть определены с помощью стандартных фармацевтических процедур в клеточных культурах или на экспериментальных животных, например, путем определения LD₅₀ (дозы, летальной для 50% популяции) и ED₅₀ (дозы, терапевтически эффективной у 50% популяции). Отношение доз, дающих токсические и терапевтические эффекты, называется терапевтическим индексом, и оно может быть выражено как отношение LD₅₀/ED₅₀. Соединения, которые дают высокие терапевтические индексы, являются предпочтительными. Поскольку могут быть использованы соединения, которые дают токсические побочные эффекты, то следует соблюдать осторожность при разработке системы доставки, которая доставляет такие соединения на участок пораженной ткани, для того, чтобы свести к минимуму потенциальную опасность повреждения неинфицированных клеток и, тем самым, уменьшить побочные эффекты.

Данные, полученные в анализах на клеточных культурах и в исследованиях на животных, могут быть использованы при определении интервала доз для их введения человеку. Доза таких соединений составляет предпочтительно в пределах диапазона циркулирующих концентраций, которые включают ED₅₀ с небольшой токсичностью или с отсутствием токсичности. Доза может варьироваться в пределах этого интервала в зависимости от используемой лекарственной формы и способа введения. Для любого соединения, используемого в способе согласно изобретению, терапевтически эффективная доза может быть предварительно вычислена с помощью анализов на клеточных культурах. Эта доза может быть приготовлена для введения животным-моделям в целях достижения диапазона циркулирующих концентраций в плазме, которые включают IC₅₀ (т.е. концентрацию тестируемого соединения, при которой достигается полумаксимальное ингибирование симптомов), как было определено в клеточной культуре. Такая информация может быть использована в целях более точного определения доз для введения человеку. Уровни в плазме могут быть измерены, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный здесь антисмысловой олигонуклео-

тид растворяют в стерильной воде, физиологическом растворе (например, забуференном фосфатом физиологическом растворе) или цереброспинальной жидкости (CSF) для введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный здесь антисмысловой олигонуклеотид вводят интракальвально, например, посредством болясной инъекции в межпозвонковое пространство L3 или L4 или путем инfusionии с помощью интракальвального насоса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения приблизительно 0,001-1000 мг (например, приблизительно 0,1-800 мг, приблизительно 1-600 мг, приблизительно 10-500 мг, приблизительно 50-450 мг, приблизительно 80-300 мг, приблизительно 100-200 мг) описанного здесь антисмылового олигонуклеотида вводят индивидууму, нуждающемуся в этом.

Наборы.

Настоящее изобретение также относится к наборам, включающим описанные выше один или более антисмыловых олигонуклеотидов и инструкции по их применению. Инструкции по применению могут включать инструкции по диагностике или лечению tau-ассоциированного заболевания. Описанные выше наборы могут быть использованы в соответствии с любыми описанными здесь методами. Специалистам в данной области известны и другие подходящие способы применения описанных здесь наборов, и специалист будет иметь возможность использовать наборы для таких применений. Описанные выше наборы могут быть также вложены в почтовую посылку (например, в оплаченный на почте конверт или почтовый пакет), которая может быть использована для пересылки образца для анализа, например, в лабораторию. Набор может включать один или более контейнеров для образца, либо образец может находиться в стандартном флаконе для забора крови. Набор может также включать одну или более форм информированного согласия, бланк заявки на проведение теста и инструкции по применению набора в способе, описанном в настоящей заявке. Методы использования таких наборов также описаны в настоящей заявке. Одна или более форм (например, бланк заявки на проведение теста) и контейнер для образца могут быть закодированы, например, с помощью штрих-кода для идентификации индивидуума, который предоставил данный образец.

Специалистам в данной области техники будут очевидны многочисленные методы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящей заявке, и которые могут быть использованы для практического осуществления настоящего изобретения. Действительно, настоящее изобретение никоим образом не ограничено описанными здесь методами и материалами.

Примеры

Настоящее изобретение более подробно описано в нижеследующих примерах, которые не ограничивают объема изобретения, изложенного в формуле изобретения.

Пример 1. Общие материалы и методы.

Синтез и очистка антисмыловых олигонуклеотидов.

Описанные здесь модифицированные антисмыловые олигонуклеотиды были получены с использованием стандартной фосфорамидитной химии на синтезаторе Mermadel92 (BioAutomation) для использования *in vitro* и на Mermadel 12 (Bio Automation) для использования *in vivo*. Фосфорамидиты растворяли в ацетонитриле при концентрации 0,15M (0,08M на Mermadel92), а связывание проводили путем активации фосфорамидитов 0,5M раствором 5-этилтиотетразола в ацетонитриле (0,25M на Mermadel92). Время связывания обычно составляло 3-4 мин. Сульфирование осуществляли с использованием 0,2M раствора фенилацетидисульфида в течение 5 мин. Окисление осуществляли с использованием 0,02M раствора йода в пиридине (20%)/воде (9,5%)/тетрагидрофуране (70,5%) в течение 2 мин. Кэпирование осуществляли с использованием стандартных кэпирующих реагентов. Растущие олигонуклеотидные цепи были подвергнуты детритилированию для последующего связывания с 3% дихлоруксусной кислотой в толуоле. После получения последовательностей соединения, связанные с носителем, расщепляли и подвергали реакции снятия защиты с использованием жидкого гидроксида аммония при 65°C в течение 2 ч. Полученные неочищенные растворы непосредственно очищали с помощью ВЭЖХ (Akta Explorer). Очищенные фракции анализировали с помощью масс-спектрометрии и количественно оценивали путем УФ-облучения с коэффициентом экстинкции на 260 нм. Собранные фракции обессоливали и лиофилизовали досуха.

In vitro тестирование антисмыловых олигонуклеотидов.

Антисмыловые олигонуклеотиды тестировали *in vitro* в различных клеточных линиях, включая, но не ограничиваясь ими, человеческие клеточные линии, такие как клетки Huh7, клетки HeLa и клетки SH-SY5Y, и клеточные линии зеленой мартышки COS1.

Клетки были получены от коммерческих поставщиков (например, из Американской коллекции типовых культур (ATCC), Manassas, VA) и были культивированы в соответствии с инструкциями производителей.

Антисмыловые олигонуклеотиды также тестировали в человеческих нейронах, полученных из человеческих эмбриональных стволовых клеток (hESC), которые были взяты из Научно-исследовательского института WiCell, Inc., находящегося в городе Мэдисон, штат Висконсин, США. Клетки hESC были превращены в функциональные нейронные клетки путем принудительной экспрессии нейрогенина-2 (Ngn2), т.е. фактора транскрипции, специфичного к линии дифференцировки нейронных

клеток. Конструкцию Ngn2 доставляли в hESC с использованием лентивирусов для конститутивной экспрессии rtTA и индуцируемой тетрациклином экспрессии экзогенных белков, стимулируемых промотором tetO. Образцы были получены в соответствии с Руководствами по проведению исследований на человеческих эмбриональных стволовых клетках, установленных Национальным Институтом медицины Национальной академии ("NAS Guidelines) и Организацией по защите прав человека, участвующего в исследованиях, в соответствии с нормами по защите прав человека ("DHHS"), одобренными сотрудниками Департамента по охране здоровья человека (ст.45 кодекса законов США, ч. 1Q).

Антисмыловые олигонуклеотиды были введены в культивированные клетки путем трансфекции или нуклеофекции, когда клетки достигали приблизительно 60-80% конфлюэнтности в культуре. Для трансфекции антисмыловые олигонуклеотиды смешивали с реагентом для трансфекции OptiFect™ (Life Tech Cat # 12579-017) в соответствующих средах для культивирования клеток до достижения желаемой концентрации антисмылового олигонуклеотида и концентрации OptiFect™ в интервале от 2 до 12 мкг/мл на 100 нМ антисмылового олигонуклеотида. Для нуклеофекции антисмыловые олигонуклеотиды были введены в клетки нейробластомы SH-SY5Y с помощью устройства Amaxa Nucleofector-II (Lonza, Walkersville, MD). Для оценки эффективности ASO нуклеофекцию осуществляли в 96-луночных планшетах. Раствор Nucleofector SF был выбран исходя из высокой жизнеспособности клеток и эффективной трансфекции после предварительных экспериментов. В день нуклеофекции культуры с 60-80% конфлюэнтностью обрабатывали трипсином и клетки высевали в каждую лунку. Человеческие нейроны, происходящие от hESC, обрабатывали путем добавления 1 или 10 мкМ антисмыловых олигонуклеотидов в среду, подходящую для пассивного поглощения.

Клетки собирали через 24-72 ч после обработки антисмыловыми олигонуклеотидами, в затем мРНК или белок tau выделяли и оценивали методами, известными специалистам и описанными в настоящей заявке. Вообще говоря, если обработку проводили с несколькими повторами, то данные были представлены как среднее для повторных обработок. Концентрацию используемого антисмылового олигонуклеотида изменяли от одной клеточной линии к другой клеточной линии. Методы определения оптимальной концентрации антисмылового олигонуклеотида для конкретной клеточной линии хорошо известны специалистам. Антисмыловые олигонуклеотиды обычно используют при концентрациях в пределах от 1 до 1000 нМ при трансфекции OptiFect; и при концентрациях в пределах от 25 до 20000 нМ при трансфекции посредством нуклеофекции.

Количественное определение уровня мРНК МАРТ (tau) осуществляли с помощью количественной ПЦР в реальном времени с использованием системы ПЦР в реальном времени (ViiA7 Real-Time PCR) (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителей. Перед проведением ПЦР в реальном времени выделенную РНК подвергали реакции обратной транскрипции, которая продуцировала комплементарную ДНК (кДНК), и эта ДНК была затем использована в качестве субстрата для ПЦР-амплификации в реальном времени. Реакции обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени проводили последовательно в одних и тех же лунках с образцом. Мультиплексный набор для клеток Fastlane (Qiagen Cat # 216513) использовали для лизиса клеток в лунке и обратной транскрипции мРНК в кДНК непосредственно из культивируемых клеток без очистки РНК. Затем кДНК были использованы для анализа на экспрессию tau с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Уровни мРНК tau, определенные с помощью ПЦР в реальном времени, нормализовали по уровню экспрессии гена "домашнего хозяйства", который является постоянным в клетках, например, такого гена, как человеческий ген глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAPDH), человеческий ген белка, связывающегося с ТАТА-боксом (TBP), или человеческий ген гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (HPRT1).

Анализы на экспрессию генов TaqMan были проведены с помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени в соответствии с протоколом, описанным в наборе для проведения мультиплексной ОТ-ПЦР QuantiTect (Qiagen Cat # 204643) с использованием дуплексной реакции ОТ-ПЦР. Были использованы зонды TaqMan, специфичные к человеческому МАРТ (LifeTech AssayID # Hs00902194_m1: FAM-MGB), человеческому GAPDH (LifeTech AssayID # Hs02758991_g1: VIC-MGB), человеческому TBP (LifeTech Cat # 4326322E) или человеческому HPRT1 (LifeTech Cat # 4333768T). Образцы были подвергнуты ПЦР-реакции в реальном времени на системе ViiA7 (Life Technologies) в соответствии с рекомендованными условиями проведения циклов дуплексной ОТ-ПЦР. Все данные были скорректированы по количеству исходной кДНК, а уровни мРНК tau нормализованы по уровням эндогенного эталонного гена. Ген tau и контрольный ген амплифицировали в одной и той же реакции ПЦР с аналогичной высокой эффективностью, что позволяло проводить относительную количественную оценку методом ААСТ. Результаты были представлены как процент остаточной мРНК tau по отношению к контрольным клеткам, обработанным PBS.

Тестирование *in vivo* антисмыловых олигонуклеотидов.

Антисмыловые олигонуклеотиды для МАРТ были протестированы *in vivo* путем доставки ASO в цереброспинальную жидкость (CSF) мышей через интрацеребральный желудочек (ICV). Мышей анестезировали 5% изофлураном, после чего содержание изофлурана в кислороде/азотсодержащем кислороде снижали до 1,5-2% и сохраняли на этом уровне в течение всей хирургической операции. Температуру

прямой кишки поддерживали при $36,9 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ с помощью гомеотермического нагревательного элемента и ректального зонда. Анестезированных мышей помещали в стереотаксический аппарат, шерсть на голове выбиривали и дезинфицировали раствором повидона-йода (Betadine). Перед разрезом мышам вводили бупренорфин (Temgesic, 0,03 мг/кг, 1 мл/кг, подкожно). После этого делали разрез для обнажения черепа в целях определения координат головного мозга для инъекции. Инъекцию (общим объемом 2 мкл) делали с использованием 10 мкл-шприца Гамильтона и иглы калибра 28 с помощью микронасоса (Harvard Apparatus) в правый боковой желудочек для всех животных при следующих координатах: AP=+0,5 мм; ML=1,0 мм; DV=-2,5 мм. Скорость потока составляла 1 мкл/мин, и иглу оставляли на месте в течение 1 мин после инфузии, а затем вынимали. После этого кожу закрывали и мышей оставляли для восстановления в отдельных клетках, после чего возвращали в клетки их обычного содержания. Затем вводили дополнительные дозы бупренорфина (Temgesic, 0,03 мг/кг, 1 мл/кг, подкожно) два раза в день в течение первых 48 ч.

Животные подвергались ежедневному мониторингу специалистом по работе с лабораторными животными. Затем был проведен мониторинг общего состояния животных и заживления ран, и ежедневно измеряли массу тела. По окончании этой процедуры животных глубоко анестезировали пентобарбитал-натрием (60 мг/кг Mebumat, Orion Pharma, Finland). Мышам делали пункцию в области большой цистерны и собирали CSF (3-5 мкл на мышь). После этого мышам делали сердечную пункцию и брали пробы крови. Приблизительно 0,4-0,5 мл крови собирали в пластиковые 500 мкл-пробирки с антикоагулантом Lavender K2EDTA и центрифугировали при $2000 \times g$ в течение 10 мин при 4°C , а затем плазму разделяли на аликвоты. После этого мышей обезглавливали, собирали головной мозг и разрезали на различные участки, такие как кора головного мозга, гиппокамп и мозжечок. Кроме того, также был собран спинной мозг.

Пример 2. Ингибирование экспрессии человеческого Tau в клетках Huh7 посредством 18-мерных стерических блокаторов 2'-О-МОЕ.

Стерические блокаторы антисмысловых олигонуклеотидов были сконструированы так, чтобы они были нацелены на стыки инtron-экзон конститутивных экзонов в человеческом Tau, т.е. инвариабельных экзонов, присутствующих во всех изоформах. Стерические блокаторы антисмысловых олигонуклеотидов конструировали так, чтобы они индуцировали исключение экзона, либо путем гибридизации с инtronными последовательностями точек ветвления, либо путем нацеления непосредственно на сайты сплайсинга, объединения инtronных и экзонных последовательностей и сайтов усиления сплайсинга экзонов. Стерические блокаторы, нацеленные на МАРТ, были сначала сконструированы как последовательности длиной 18 нуклеозидов с 2'-О-(2-метоксиэтил) (2'-О-МОЕ) -модификацией сахара рибозы во всех нуклеозидах, которые действуют за счет стерических затруднений и не активируют РНКазу Н или RISC. Все межнуклеозидные связи являются фосфодиэфирными связями. Затем был проведен несмещенный скриппинг для 18-мерных однородно модифицированных 2'-МОЕ-ASO с фосфодиэфирным остовом. Были проведены анализы BLAST для каждой последовательности морфолино-олигонуклеотида во избежание гибридизации с элементом, не являющимся мишенью.

18-Мерные 2'-О-МОЕ-стериические блокаторы, нацеленные на tau, тестировали *in vitro* на их активность в ингибировании мРНК человеческого tau. Клетки Huh7 высевали при плотности 10000 клеток на лунку и трансфицировали реагентом OptiFect (Lifetech Cat# 12579-017) под действием 25 нМ антисмыслового олигонуклеотида. После обработки в течение 48 ч кДНК непосредственно выделяли из культуры выделенных клеток с использованием мультиплексного набора для клеток FastLane (Qiagen Cat # 216513). Уровни мРНК tau измеряли с помощью количественной ПЦР в реальном времени в дуплексной ОТ-ПЦР с использованием зондов TaqMan, специфичных к человеческому МАРТ (LifeTech AssayID # Hs00902194_m1: FAM-MGB) и человеческому ТВР (белку, связывающемуся с ТАТА-боксом), используемому в качестве эндогенного контроля (LifeTech Cat # 4326322E). Все данные были скорректированы по количеству исходной кДНК, а уровни мРНК tau нормализовали по уровням эндогенного эталонного гена ТВР. Ген tau и контрольный ген ТВР амплифицировали в одной и той же реакции ПЦР с аналогичной высокой эффективностью, что позволяло проводить относительную количественную оценку методом $\Delta\Delta\text{CT}$. Результаты были представлены как процент остаточной мРНК tau по отношению к контрольным клеткам, обработанным PBS. В табл. 2 проиллюстрированы активности этих 18-мерных 2'-О-МОЕ-стериических блокаторов в клетках Huh7.

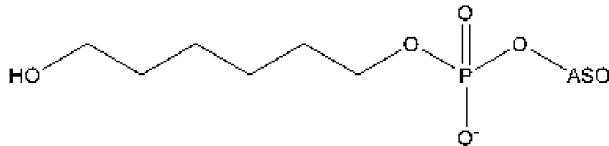
Таблица 2

Ингибирование мРНК tau 18-мерными 2'-О-МОЕ-стериическими блокаторами в клетках Huh7

| SEQ ID NO | Последовательность ASO ¹ | % Остаточной мРНК ² |
|-----------|-------------------------------------|--------------------------------|
| 1 | GTCCACTAACCTTCAGG | 19,5 |
| 2 | GCATCGTCAGCTTACCTT | 27,7 |
| 3 | TATTGCACCTGGAGATG | 38,4 |
| 4 | GACTATTTGCACCTGGAG | 40,8 |
| 5 | CATGCGAGCTGATAAAAT | 40,9 |
| 6 | ACCATGCGAGCTGATAAA | 41,3 |
| 7 | CCATGCGAGCTGATAAAA | 43,3 |
| 8 | CGTCAGCTTACCTGGCT | 44,1 |
| 9 | TGACCATGCGAGCTGATA | 47,4 |
| 10 | ATGCGAGCTGATAAAATA | 52,1 |
| 11 | TTTGCACCTGGAGATGAG | 52,3 |
| 12 | TTGCACCTGGAGATGAGA | 52,4 |
| 13 | ATTTGCACCTGGAGATGA | 61,9 |
| 14 | TCCACTAACCTTCAGGC | 68,2 |
| 15 | GGTTTCAATCTGCAAGAA | 68,8 |
| 16 | CCACTAACCTTCAGGCC | 71,3 |
| 17 | CACTAACCTTCAGGCCA | 72,9 |
| 18 | ACTAACCTTCAGGCCAG | 76,7 |
| 19 | GCTCAGCCATCCTGGTTC | 77,3 |
| 20 | GTTTCAATCTGCAAGAAG | 80,4 |
| 21 | AGTTCACCTGGGAAAGA | 85,8 |
| 22 | TTGGAGGTTCACCTGGGA | 85,9 |
| 23 | GGCTACCTGGTTATGAT | 88,8 |
| 24 | AAAGTTCACCTGGGAAA | 92,1 |
| 25 | GTTCACTGACCTTGGTTC | 96,8 |
| 26 | CAAAGTTCACCTGGGAA | 98,4 |
| 27 | CAGCTTACCTGGCTTTT | 99,8 |
| 28 | GGGCTACCTGGTTATGA | 101,6 |
| 29 | TCTTCAGCTGGTGTATGT | 103,4 |
| 30 | TTCAAAGTTCACCTGGGG | 103,4 |
| 31 | CCCTTACCTTTTATT | 104,7 |
| 32 | TGCTTCTTCAGCTGGTGT | 106,1 |
| 33 | TCAGCTTACCTGGCTTT | 106,7 |
| 34 | CTGCTTCTTCAGCTGGTG | 107,9 |
| 35 | GGCCACCTCCTAGAACAC | 108,4 |
| 36 | TCTTACCAAGCTGGGTG | 108,8 |
| 37 | AAGTTCACCTGGGAAAG | 109,4 |
| 38 | GTCAGCTTACCTGGCTT | 109,5 |
| 39 | GGGGCCTGATCACAAACC | 109,7 |
| 40 | AGGTTCACCTGGGAAGGA | 110,2 |
| 41 | GCTTACCTGGCTTTTT | 111,4 |
| 42 | TCAAAGTTCACCTGGGGA | 111,7 |
| 43 | CCACTCTCACCTCCCGC | 112,8 |
| 44 | CCCCCTTACCTTTTAT | 113 |
| 45 | GAGGTTCACCTGGGAAGG | 113,3 |
| 46 | GTTCACCTGGGAAGGAAG | 113,6 |
| 47 | CACCTCCTAGAACACAA | 114,1 |
| 48 | ACTCTCACCTCCCGCCT | 114,5 |
| 49 | TTCAATCTGCAAGAAGAG | 114,6 |
| 50 | ACTGACCTGGGTACGT | 114,7 |
| 51 | TTTCAATCTGCAAGAAGA | 115,1 |
| 52 | TTCTTACCAAGAGCTGGGT | 115,5 |
| 53 | CAGGGCTACCTGGTTAT | 116,1 |
| 54 | GGGCCTGATCACAAACCC | 116,5 |
| 55 | AGGGCTACCTGGTTATG | 117,2 |

| | | |
|----|----------------------|--------|
| 56 | CCACCTCCTAGAACACAA | 117, 6 |
| 57 | CACTGACCTTGGTCACG | 118, 4 |
| 58 | CCCCTTACCTTTTATT | 118, 4 |
| 59 | TTCACTGACCTTGGTC | 118, 6 |
| 60 | GGCCTGATCACAAACCT | 119, 6 |
| 61 | CACTCTCACCTCCGCC | 119, 7 |
| 62 | CCTGGCCACCTCTAGAA | 120, 4 |
| 63 | CCTTTACCTTTTATTTC | 120, 6 |
| 64 | TCACTGACCTTGGGTCA | 121, 7 |
| 65 | GCCTGATCACAAACCTG | 122 |
| 66 | CTTTACCTTTTATTTC | 122, 5 |
| 67 | TTCTTCAGCTGGTGATG | 124 |
| 68 | GCCACCTCCTAGAACACA | 126, 5 |
| 69 | TCTCACCTCCCCCTCC | 127, 4 |
| 70 | CTTCTTACCAAGAGCTG | 129, 8 |
| 71 | TTCTTCCTTACCAAGAGCTG | 131, 2 |
| 72 | ATCAGCCCCCTGTAAATG | 131, 3 |
| 73 | GCTTCTTCAGCTGGTGT | 133, 9 |
| 74 | ACAGGGCTACCTGGTTA | 134, 3 |
| 75 | CTCAGCCATCCTGGTCA | 134, 4 |
| 76 | CAGCCCCCTGTAAATGAA | 136, 4 |
| 77 | GGGCTCAGCCATCCTGGT | 137, 9 |
| 78 | TCTTCTTACCAAGAGCTGG | 139 |
| 79 | CTCTCACCTCCCCCTCC | 143, 1 |
| 80 | TCAGCCCCCTGTAAATGA | 145, 9 |
| 81 | CTTCTTCAGCTGGTGTAT | 148 |
| 82 | GGTTCACCTGGGAAGGAA | 153, 5 |
| 83 | CATCAGCCCCCTGTAAAT | 156, 4 |
| 84 | ACCATCAGCCCCCTGTAA | 157, 5 |

1. Каждый нуклеотид имеет 2'-О-метоксиэтильную (2'-O-MOE)-модификацию, а межнуклеозидные связи являются фосфодиэфирами. Каждый олигонуклеотид имеет линкер (L1), присоединенный к 3'-концу ASO посредством фосфатного мостика, и имеет следующую структуру:



2. % Остаточной мРНК означает уровень мРНК tau в клетках Huh7, обработанных одной дозой 25 нМ ASO tau в течение 48 ч, по сравнению с уровнем мРНК tau в контрольных клетках Huh7, обработанных PBS. Так, например, 19,5% остаточная мРНК означает ASO SEQ ID NO: 1, обладающая 80,5% активностью в снижении уровня мРНК tau.

Пример 3. Ингибирование экспрессии человеческого Tau в клетках SH-SY5Y под действием 18-мерных 2'-O-MOE-стериических блокаторов.

Стерические блокаторы, которые значительно снижают уровень экспрессии tau, как описано в примере 2, были отобраны и протестированы в человеческих клетках нейробластомы SH-SY5Y. Культивируемые клетки SH-SY5Y подвергали нуклеофекции под действием 1000 нМ выбранного антисмыслового олигонуклеотида. После обработки в течение приблизительно 24 ч кДНК непосредственно выделяли из культивированных клеток с использованием мультиплексного набора для клеток Fastlane (Qiagen Cat # 216513). Уровни мРНК tau измеряли с помощью количественной ПЦР в реальном времени с использованием дуплексной ОТ-ПЦР. Были использованы зонды Тацман, специфичные к человеческому МАРТ (Lifetech AssayID # Hs00902194_m1: FAM-MGB) и человеческому GAPDH (LifeTech AssayID # Hs02758991_g1: VIC-MGB). Все данные были скорректированы по количеству исходной кДНК, а уровни мРНК tau нормализованы по уровням эндогенного эталонного гена GAPDH. Ген tau и контрольный ген GAPDH амплифицировали в одной и той же реакции ПЦР с аналогичной высокой эффективностью, что позволяло проводить относительную количественную оценку методом ΔΔСТ. Результаты были представлены как процент остаточной мРНК tau по отношению к контрольным клеткам, обработанным PBS. В табл. 3 проиллюстрированы активности отобранных 18-мерных 2'-O-MOE-стериических блокаторов в клетках SH-SY5Y.

Таблица 3

Ингибирование мРНК tau 18-мерными 2'-О-МОЕ-стериическими блокаторами в клетках SH-SY5Y

| ASO SEQ ID NO | % Остаточной мРНК ³ |
|---------------|--------------------------------|
| 6 | 5,74 |
| 7 | 6,90 |
| 9 | 8,63 |
| 2 | 9,26 |
| 5 | 9,64 |
| 4 | 14,01 |
| 8 | 14,24 |
| 10 | 15,75 |
| 12 | 26,14 |
| 3 | 29,40 |
| 11 | 34,34 |
| 1 | 37,95 |

3. % Остаточной мРНК означает уровень мРНК tau в клетках, SH-SY5Y, обработанных одной дозой 1000 нМ ASO tau в течение 24 ч, по сравнению с уровнем мРНК tau в контрольных клетках, обработанных PBS.

Стерические блокаторы, которые в значительной степени ингибировали *in vitro* мРНК tau, тестировали при различных дозах. Культивируемые клетки SH-SY5Y были подвергнуты нуклеофекции под действием 0,125 нМ, 0,25 нМ, 0,5 нМ, 1000 нМ 2000 нМ, 4000 нМ и 8000 нМ одного выбранного антисмыслового олигонуклеотида. После обработки в течение приблизительно 24 ч сразу получали кДНК и определяли уровни мРНК tau с помощью количественной ПЦР в реальном времени, как описано выше. Полумаксимальную ингибирующую концентрацию (IC_{50}) определяли путем построения кривой доза-ответ и оценки влияния различных концентраций антисмыловых олигонуклеотидов на снижение уровня мРНК Tau. Величины IC_{50} вычисляли путем определения концентрации, необходимой для ингибирования полумаксимального биологического ответа соединения, и эти величины могут быть использованы в качестве меры активности антисмылового олигонуклеотида. В табл. 4 указаны величины IC_{50} для отобранных 18-мерных 2'-О-МОЕ-стериических блокаторов.

Таблица 4

IC₅₀ отобранных 18-мерных 2'-О-МОЕ-стериических блокаторов

| ASO SEQ ID NO | IC50 (нМ) |
|---------------|-----------|
| 7 | 65 |
| 5 | 88 |
| 6 | 103 |
| 2 | 200 |
| 4 | 288 |
| 10 | 290 |
| 12 | 430 |
| 3 | 490 |
| 11 | 560 |
| 1 | 590 |

Пример 4. Ингибирование экспрессии человеческого Tau в клетках SH-SY5Y под действием 12-25-мерных 2'-О-МОЕ-стериических блокаторов.

Стерические блокаторы, которые значительно снижали уровень экспрессии tau, как описано в примерах 2 и 3, были отобраны и получены так, чтобы их длина варьировалась от 12 до 25 нуклеозидов. Эти 12-25-мерные 2'-О-МОЕ-стериические блокаторы были протестированы в клетках SH-SY5Y. Культивируемые клетки SH-SY5Y были подвергнуты нуклеофекции под действием 2000 нМ выбранного антисмылового олигонуклеотида. После обработки в течение приблизительно 24 ч сразу получали кДНК и определяли уровни мРНК Tau, как описано выше. В табл. 5 представлены активности 12-25-мерных 2'-О-МОЕ-стериических блокаторов в клетках SH-SY5Y.

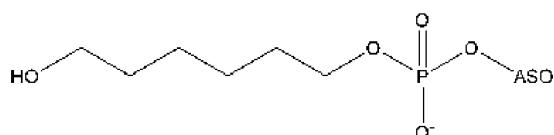
Таблица 5

Ингибирование мРНК Tau в клетках SH-SY5Y под действием 12-25-мерных 2'-О-MOE-стериических блокаторов

| SEQ ID NO | Последовательность ASO ⁴ | % Остаточной мРНК ⁵ | Длина ASO | Нацеливание на экзон Tau |
|-----------|--|--------------------------------|-----------|--------------------------|
| 85 | GT ⁿ C ⁿ CA ⁿ CTAA ⁿ C ⁿ CTTT ⁿ CAGG ⁿ C ⁿ CGTGT | 61,7 | 25 | 1 |
| | "C | | | |
| 86 | GT ⁿ C ⁿ CA ⁿ CTAA ⁿ C ⁿ CTTT ⁿ CAGG ⁿ C ⁿ CGTGT | 61,6 | 24 | 1 |
| 87 | GT ⁿ C ⁿ CA ⁿ CTAA ⁿ C ⁿ CTTT ⁿ CAGG ⁿ C ⁿ CGTGT | 74,7 | 23 | 1 |
| 88 | GT ⁿ C ⁿ CA ⁿ CTAA ⁿ C ⁿ CTTT ⁿ CAGG ⁿ C ⁿ CGT | 49,2 | 22 | 1 |
| 89 | GT ⁿ C ⁿ CA ⁿ CTAA ⁿ C ⁿ CTTT ⁿ CAGG ⁿ C ⁿ CG | 60,2 | 21 | 1 |
| 90 | GT ⁿ C ⁿ CA ⁿ CTAA ⁿ C ⁿ CTTT ⁿ CAGG ⁿ C ⁿ C | 60,6 | 20 | 1 |
| 91 | GT ⁿ C ⁿ CA ⁿ CTAA ⁿ C ⁿ CTTT ⁿ CAGG ⁿ C | 67,8 | 19 | 1 |
| 92 | GT ⁿ C ⁿ CA ⁿ CTAA ⁿ C ⁿ CTTT ⁿ CAGG | 61,6 | 18 | 1 |
| 93 | GT ⁿ C ⁿ CA ⁿ CTAA ⁿ C ⁿ CTTT ⁿ CAG | 58,7 | 17 | 1 |
| 94 | GT ⁿ C ⁿ CA ⁿ CTAA ⁿ C ⁿ CTTT ⁿ CA | 65,4 | 16 | 1 |
| 95 | GT ⁿ C ⁿ CA ⁿ CTAA ⁿ C ⁿ CTTT ⁿ C | 64,2 | 15 | 1 |
| 96 | GT ⁿ C ⁿ CA ⁿ CTAA ⁿ C ⁿ CTTT | 72,5 | 14 | 1 |
| 97 | GT ⁿ C ⁿ CA ⁿ CTAA ⁿ C ⁿ CTT | 75,3 | 13 | 1 |
| 98 | GT ⁿ C ⁿ CA ⁿ CTAA ⁿ C ⁿ CT | 87,1 | 12 | 1 |
| 99 | G ⁿ CAT ⁿ CGT ⁿ CAG ⁿ CTTA ⁿ C ⁿ CTTG ⁿ CTTT T | 35,4 | 25 | 5 |
| 100 | G ⁿ CAT ⁿ CGT ⁿ CAG ⁿ CTTA ⁿ C ⁿ CTTG ⁿ CTTT | 35,3 | 24 | 5 |
| 101 | G ⁿ CAT ⁿ CGT ⁿ CAG ⁿ CTTA ⁿ C ⁿ CTTG ⁿ CTT | 37,8 | 23 | 5 |
| 102 | G ⁿ CAT ⁿ CGT ⁿ CAG ⁿ CTTA ⁿ C ⁿ CTTG ⁿ CT | 38,7 | 22 | 5 |
| 103 | G ⁿ CAT ⁿ CGT ⁿ CAG ⁿ CTTA ⁿ C ⁿ CTTG ⁿ C | 50,2 | 21 | 5 |
| 104 | G ⁿ CAT ⁿ CGT ⁿ CAG ⁿ CTTA ⁿ C ⁿ CTTG | 49,5 | 20 | 5 |
| 105 | G ⁿ CAT ⁿ CGT ⁿ CAG ⁿ CTTA ⁿ C ⁿ CTTG | 42,2 | 19 | 5 |
| 106 | G ⁿ CAT ⁿ CGT ⁿ CAG ⁿ CTTA ⁿ C ⁿ CTT | 25,2 | 18 | 5 |
| 107 | G ⁿ CAT ⁿ CGT ⁿ CAG ⁿ CTTA ⁿ C ⁿ CCT | 15,0 | 17 | 5 |
| 108 | G ⁿ CAT ⁿ CGT ⁿ CAG ⁿ CTTA ⁿ C ⁿ C | 10,6 | 16 | 5 |
| 109 | G ⁿ CAT ⁿ CGT ⁿ CAG ⁿ CTTA ⁿ C | 14,4 | 15 | 5 |
| 110 | G ⁿ CAT ⁿ CGT ⁿ CAG ⁿ CTTA | 11,9 | 14 | 5 |
| 111 | G ⁿ CAT ⁿ CGT ⁿ CAG ⁿ CTT | 19,6 | 13 | 5 |
| 112 | G ⁿ CAT ⁿ CGT ⁿ CAG ⁿ CT | 33,8 | 12 | 5 |
| 113 | GA ⁿ CTATTG ⁿ CA ⁿ C ⁿ CTGGAGATGAGAG | 39,7 | 25 | 11 |
| 114 | GA ⁿ CTATTG ⁿ CA ⁿ C ⁿ CTGGAGATGAGA | 41,1 | 24 | 11 |
| 115 | GA ⁿ CTATTG ⁿ CA ⁿ C ⁿ CTGGAGATGAG | 45,7 | 23 | 11 |
| 116 | GA ⁿ CTATTG ⁿ CA ⁿ C ⁿ CTGGAGATGA | 54,2 | 22 | 11 |
| 117 | GA ⁿ CTATTG ⁿ CA ⁿ C ⁿ CTGGAGATG | 53,2 | 21 | 11 |
| 118 | GA ⁿ CTATTG ⁿ CA ⁿ C ⁿ CTGGAGAT | 63,6 | 20 | 11 |
| 119 | GA ⁿ CTATTG ⁿ CA ⁿ C ⁿ CTGGAGA | 50,6 | 19 | 11 |
| 120 | GA ⁿ CTATTG ⁿ CA ⁿ C ⁿ CTGGAG | 51,0 | 18 | 11 |

| | | | | |
|-----|--|------|----|----|
| 121 | GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CTGGA | 38,4 | 17 | 11 |
| 122 | GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CTGG | 41,2 | 16 | 11 |
| 123 | GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CTG | 45,6 | 15 | 11 |
| 124 | GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CT | 46,8 | 14 | 11 |
| 125 | GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m C | 47,5 | 13 | 11 |
| 126 | GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C | 56,2 | 12 | 11 |
| 127 | ^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAAATATAAAA | 20,0 | 25 | 5 |
| 128 | ^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAAATATAAA | 14,7 | 24 | 5 |
| 129 | ^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAAATATAA | 24,9 | 23 | 5 |
| 130 | ^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAAATATA | 20,3 | 22 | 5 |
| 131 | ^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAAATAT | 24,3 | 21 | 5 |
| 132 | ^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAAATA | 27,2 | 20 | 5 |
| 133 | ^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAAAT | 23,7 | 19 | 5 |
| 134 | ^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAAA | 24,0 | 18 | 5 |
| 135 | ^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAA | 19,8 | 17 | 5 |
| 136 | ^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAA | 17,9 | 16 | 5 |
| 137 | ^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATA | 23,9 | 15 | 5 |
| 138 | ^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGAT | 87,6 | 14 | 5 |
| 139 | ^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGA | 24,6 | 13 | 5 |
| 140 | ^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTG | 23,1 | 12 | 5 |

4. Каждый нуклеотид имеет 2'-О-метоксиэтильную (2'-О-MOE)-модификацию, а ^mC означает 5-метилцитозин. Межнуклеозидные связи являются фосфодиэфирами. Каждый олигонуклеотид имеет линкер (L1), присоединенный к 3'-концу ASO посредством фосфатного мостика, и имеет следующую структуру:



5. % Остаточной мРНК означает уровень мРНК tau в клетках, SH-SY5Y, обработанных одной дозой 2000 нМ ASO tau в течение 24 ч, по сравнению с уровнем мРНК tau в контрольных клетках, обработанных PBS.

Величины IC₅₀ для выбранных 12-25-мерных 2'-О-MOE-стериических блокаторов с фосфодиэфирными межнуклеозидными связями были определены, как описано выше и приведены в табл. 6.

Был синтезирован ряд 12-25-мерных 2'-О-MOE-стериических блокаторов с фосфортиоатными межнуклеозидными связями, и величины IC₅₀ для некоторых из этих стериических блокаторов представлены в табл. 7.

Таблица 6

IC_{50} выбранных 12-25-мерных 2'-O-MOE-стериических блокаторов с фосфодиэфирными межнуклеозидными связями

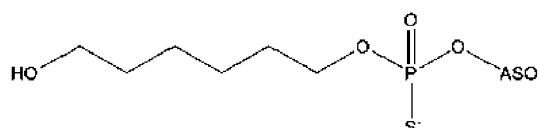
| ASO SEQ ID NO | IC_{50} (нМ) | Длина ASO |
|---------------|----------------|-----------|
| 103 | 2728 | 21 |
| 105 | 860 | 19 |
| 106 | 1793 | 18 |
| 107 | 838 | 17 |
| 108 | 791 | 16 |
| 109 | 512 | 15 |
| 110 | 728 | 14 |
| 131 | 682 | 21 |
| 133 | 1074 | 19 |
| 134 | 1482 | 18 |
| 135 | 574 | 17 |
| 136 | 544 | 16 |
| 137 | 555 | 15 |
| 138 | 1153 | 14 |
| 117 | 25610 | 21 |
| 120 | 4702 | 18 |
| 121 | 1002 | 17 |
| 122 | 1851 | 16 |
| 123 | 1870 | 15 |
| 124 | 2970 | 14 |

Таблица 7

IC_{50} выбранных 12-25-мерных 2'-O-MOE-стериических блокаторов с фосфортиоатными межнуклеозидными связями

| SEQ ID NO | Последовательность ASO ^b | IC_{50} (нМ) | Длина ASO |
|-----------|---|----------------|-----------|
| 108 | G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m C | 193 | 16 |
| 111 | G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTT | 353 | 13 |
| 109 | G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C | 426 | 15 |
| 107 | G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m CT | 579 | 17 |
| 140 | ^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTG | 877 | 12 |
| 139 | ^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGA | 930 | 13 |
| 135 | ^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAA | 1201 | 17 |
| 134 | ^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAAA | 1398 | 18 |

5. Каждый нуклеотид имеет 2'-O-метоксиэтильную (2'-O-MOE)-модификацию, а ^mC означает 5-метилцитозин. Межнуклеозидные связи являются фосфортиоатами. Каждый олигонуклеотид имеет линкер (L1), присоединенный к 3'-концу ASO посредством фосфатного мостика, и имеет следующую структуру:



Пример 5. Ингибирование экспрессии человеческого Tau в клетках SH-SY5Y под действием 17-мерных 2'-O-MOE-стериических блокаторов.

2'-MOE-стериические блокаторы, которые имеют длину 17 нуклеозидов, были сконструированы так, чтобы они были нацелены на конститутивные экзоны в человеческом Tau. Эти 17-мерные 2'-O-MOE-

стериические блокаторы были протестираны в клетках SH-SY5Y. Культивируемые клетки SH-SY5Y были подвергнуты нуклеофекции под действием 2000 нМ выбранного антисмыслового олигонуклеотида. После обработки в течение приблизительно 24 ч сразу получали кДНК и определяли уровни мРНК tau, как описано выше. В табл. 8 представлены активности 17-мерных 2'-О-МОЕ-стериических блокаторов в клетках SH-SY5Y.

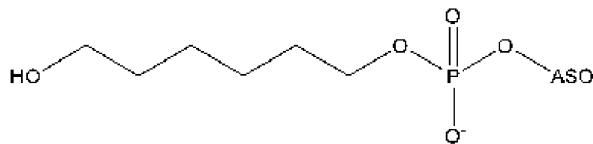
Таблица 8

Ингибиование мРНК tau в клетках SH-SY5Y под действием 17-мерных МОЕ-стериических блокаторов

| SEQ ID NO | Последовательность ASO ⁶ | % Остаточной мРНК ⁷ | Нацеливание на экзон Tau |
|-----------|--|--------------------------------|--------------------------|
| 141 | AG ^m C ^m CAT ^m C ^m CTGGTT ^m CAA | 131,7 | 1 |
| 142 | ^m CAG ^m C ^m CAT ^m C ^m CTGGTTCAA | 173,6 | 1 |
| 143 | T ^m CAG ^m C ^m CAT ^m C ^m CTGGTT ^m CA | 148,3 | 1 |
| 144 | ^m CT ^m CAG ^m C ^m CAT ^m C ^m CTGGTT ^m C | 127,7 | 1 |
| 145 | GG ^m C ^m CAG ^m CGT ^m C ^m CGTGT ^m CA | 115,9 | 1 |
| 146 | G ^m C ^m CAG ^m CGT ^m C ^m CGTGT ^m CA ^m C | 103,6 | 1 |
| 147 | ^m C ^m CAG ^m CGT ^m C ^m CGTGT ^m CA ^m C ^m C | 96,5 | 1 |
| 148 | ^m CAG ^m CGT ^m C ^m CGTGT ^m CA ^m C ^m C ^m C | 121,9 | 1 |
| 149 | GT ^m CT ^m C ^m CAATG ^m C ^m CTG ^m CTT | 125,7 | 4 |
| 150 | TGT ^m CT ^m C ^m CAATG ^m C ^m CTG ^m CT | 120,5 | 4 |
| 151 | GTGT ^m CT ^m C ^m CAATG ^m C ^m CTG ^m C | 43,5 | 4 |
| 152 | GGTGT ^m CT ^m C ^m CAATG ^m C ^m CTG | 114,1 | 4 |
| 153 | T ^m CA ^m CGTGA ^m C ^m CAG ^m CAG ^m CT | 105,1 | 4 |
| 154 | ^m CA ^m CGTGA ^m C ^m CAG ^m CAG ^m CTT | 109,1 | 4 |
| 155 | A ^m CGTGA ^m C ^m CAG ^m CAG ^m CTT ^m C | 114,6 | 4 |
| 156 | ^m CGAAG ^m CTG ^m CTGGT ^m CA ^m CG | 135,5 | 4 |
| 157 | TTTG ^m CTTTTA ^m CTGA ^m CA | 18,9 | 5 |
| 158 | ^m CTTTG ^m CTTTTA ^m CTGA ^m C ^m C | 6,8 | 5 |
| 159 | T ^m CTTG ^m CTTTTA ^m CTGA ^m C | 14,2 | 5 |
| 160 | GT ^m CTTG ^m CTTTTA ^m CTGA | 68,2 | 5 |
| 161 | TTTTTG ^m CATCG ^m CTT ^m C | 18,5 | 5 |
| 162 | TTTTG ^m CAT ^m CG ^m CTT ^m C ^m C | 20,0 | 5 |
| 163 | TTTG ^m CAT ^m CG ^m CTT ^m C ^m CA | 24,4 | 5 |
| 164 | TTTG ^m CAT ^m CG ^m CTT ^m C ^m CAG | 30,5 | 5 |
| 165 | AT ^m CTT ^m CGTTTA ^m C ^m CAT ^m C | 110,1 | 7 |
| 166 | GAT ^m CTT ^m CGTTTA ^m C ^m CAT | 111,2 | 7 |
| 167 | ^m CGAT ^m CTT ^m CGTTTA ^m C ^m CA | 108,4 | 7 |
| 168 | G ^m CGAT ^m CTT ^m CGTTTA ^m C ^m C | 131,1 | 7 |
| 169 | TGGGTGGTGT ^m CTTTGGA | 104,6 | 7 |
| 170 | GGGTGGTGT ^m CTTTGGAG | 101,6 | 7 |
| 171 | GGTGGTGT ^m CTTTGGAG ^m C | 105,3 | 7 |
| 172 | GTGGTGT ^m CTTTGGAG ^m CG | 107,4 | 7 |
| 173 | AT ^m C ^m C ^m CTGATTTGGAG | 130,3 | 9 |
| 174 | GAT ^m C ^m C ^m CTGATTTGGAG | 117,8 | 9 |
| 175 | ^m CGAT ^m C ^m C ^m CTGATTTGG | 99,7 | 9 |
| 176 | G ^m CGAT ^m C ^m C ^m CTGATTTTG | 116,1 | 9 |
| 177 | G ^m C ^m CT ^m C ^m C ^m CGG ^m CTGGTG ^m CT | 129,8 | 9 |
| 178 | ^m C ^m CT ^m C ^m C ^m CGG ^m CTGGTG ^m CTT | 135,7 | 9 |
| 179 | ^m CT ^m C ^m C ^m CGG ^m CTGGTG ^m CTT ^m C | 133,8 | 9 |
| 180 | T ^m C ^m CGG ^m CTGGTG ^m CTT ^m CA | 153,5 | 9 |
| 181 | A ^m CTGGTTGTAGA ^m CTAT | 32,6 | 11 |
| 182 | AA ^m CTGGTTGTAGA ^m CTA | 51,5 | 11 |
| 183 | ^m CAA ^m CTGGTTGTAGA ^m CT | 29,4 | 11 |
| 184 | T ^m CAA ^m CTGGTTGTAGA ^m C | 28,2 | 11 |
| 185 | TATGATGGATGTTG ^m C ^m CT | 41,7 | 11 |

| | | | |
|-----|---|-------|----|
| 186 | ATGATGGATGTTGCCTA | 46,4 | 11 |
| 187 | TGATGGATGTTGCCTAA | 40,9 | 11 |
| 188 | GATGGATGTTGCCTAAT | 53,6 | 11 |
| 189 | TTTTA ^m CTT ^m C ^m CA ^m C ^m CTGG ^m C | 130,4 | 12 |
| 190 | ATTTTA ^m CTT ^m C ^m CA ^m C ^m CTGG | 111,2 | 12 |
| 191 | GATTTTA ^m CTT ^m C ^m CA ^m C ^m CTG | 119,6 | 12 |
| 192 | AGATTTTA ^m CTT ^m C ^m CA ^m C ^m CT | 123,1 | 12 |
| 193 | ATTT ^m CT ^m C ^m CG ^m C ^m CAGGGA | 78,0 | 12 |
| 194 | TTT ^m C ^m CT ^m C ^m CG ^m C ^m CAGGGA ^m C | 76,1 | 12 |
| 195 | TT ^m C ^m CT ^m C ^m CG ^m C ^m CAGGGA ^m CG | 71,5 | 12 |
| 196 | T ^m C ^m CT ^m C ^m CG ^m C ^m CAGGGA ^m CGT | 89,0 | 12 |
| 197 | AAGGT ^m CAG ^m CTTGTTGGT | 62,1 | 13 |
| 198 | GAAGGT ^m CAG ^m CTTGTGGG | 49,9 | 13 |
| 199 | GGAGGT ^m CAG ^m CTTGTGG | 59,3 | 13 |
| 200 | ^m CGGAAGGT ^m CAG ^m CTTGTG | 51,9 | 13 |
| 201 | A ^m C ^m CTG ^m CTTGG ^m C ^m CAGGG | 116,5 | 13 |
| 202 | ^m C ^m CTG ^m CTTGG ^m C ^m CAGGGA | 106,1 | 13 |
| 203 | ^m C ^m CTG ^m CTTGG ^m C ^m CAGGGAG | 105,3 | 13 |
| 204 | ^m CTG ^m CTTGG ^m C ^m CAGGGAGG | 133,6 | 13 |

6. Каждый нуклеотид имеет 2'-О-МОЕ-модификацию, а ^mC означает 5-метилцитозин. Межнуклеозидные связи являются фосфордиэфирами. Каждый олигонуклеотид имеет линкер (L1), присоединенный к 3'-концу ASO посредством фосфатного мостика, и имеет следующую структуру:



7. % Остаточной мРНК означает уровень мРНК tau в клетках SH-SY5Y, обработанных одной дозой 2000 нМ ASO tau в течение 24 ч, по сравнению с уровнем мРНК tau в контрольных клетках, обработанных PBS.

Пример 6. Ингибирование экспрессии человеческого Tau в клетках Huh7 посредством 5-10-5-гапмеров.

Последовательности антисмысловых олигонуклеотидов были сконструированы так, чтобы они были комплементарны самой короткой изоформе tau, т.е. мРНК варианта транскрипта 4 (GenBank: NM_016841.4). Анализы BLAST проводили для каждой олигонуклеотидной последовательности во избежание гибридизации с молекулой, не являющейся мишенью. Недавно сконструированные модифицированные химерные антисмысловые олигонуклеотиды представляли собой 5-10-5-гапмеры длиной 20 нуклеозидов, где центральный гэп-сегмент содержит десять 2'-дезоксирибонуклеозидов и flankирован сегментами крыла в 5'-направлении и в 3'-направлении, включающими пять нуклеозидов, каждый из которых имеет 2'-О-МОЕ-модификацию сахара рибозы. Межнуклеозидными связями в каждом гапмере являются фосфоэтиратные (P=S) связи.

Гапмеры, нацеленные на tau, были протестированы на ингибирование экспрессии мРНК человеческого tau *in vitro*. Клетки Huh7 высевали при плотности 10000 клеток на лунку и трансфецировали реагентом OptiFect (Lifetech Cat # 12579-017) под действием 25 нМ антисмыслового олигонуклеотида. После обработки в течение 48 ч кДНК непосредственно выделяли из культивированных клеток с использованием мультиплексного набора для клеток Fastlane (Qiagen Cat # 216513). Уровни мРНК tau измеряли с помощью количественной ПЦР в реальном времени в дуплексной ОТ-ПЦР с использованием зондов Taq-Man, специфичных к человеческому МАРТ (LifeTech AssayID # Hs00902194_m1: FAM-MGB) и человеческому ТВР (белку, связывающемуся с ТАТА-боксом), используемому в качестве эндогенного контроля (LifeTech Cat # 4326322E). Все данные были скорректированы по количеству исходной кДНК, а уровни мРНК tau нормализованы по уровням эндогенного эталонного гена ТВР. Ген tau и контрольный ген ТВР амплифицировали в одной и той же реакции ПЦР с аналогичной высокой эффективностью, что позволяло проводить относительную количественную оценку методом ДДСТ. Результаты представлены как процент остаточной мРНК tau по отношению к контрольным клеткам, обработанным PBS. В табл. 9 проиллюстрированы активности этих гапмеров в клетках Huh7.

Таблица 9

Ингибирование мРНК Tau посредством 5-10-5-МОЕ-гапмеров в клетках HuH7

| SEQ ID NO | Последовательность ASO ⁸ | % Остаточной мРНК ⁹ |
|-----------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| | | мРНК ⁹ |
| 205 | C*C*G*T*A*CGTCCCAGCGT*G*A*T*C* | 22,5 |
| 206 | G*G*C*T*C*AGCCATCCTGG*T*T*C*A* | 26,4 |
| 207 | C*C*C*G*T*ACGTCCCAGCG*T*G*A*T* | 29 |
| 208 | G*G*T*T*G*ACATCGTCTGC*C*T*G*T* | 29,1 |
| 209 | G*G*G*C*T*CAGCCATCCTG*G*T*T*C* | 30,1 |
| 210 | G*G*C*C*A*GCGTCCGTGTC*A*C*C*C* | 32,8 |
| 211 | G*G*C*T*C*TCCCAGCGCA*A*G*G*A* | 32,8 |
| 212 | C*C*C*T*C*TTGGTCTTGGT*G*C*A*T* | 33,2 |
| 213 | C*G*G*G*A*CCTGCCTCCA*G*A*C*C* | 33,6 |
| 214 | G*C*T*G*G*TCTCTGTTGGG*T*C*C*C* | 34,5 |
| 215 | G*G*G*C*T*CTCTCCATGTC*A*A*C*A* | 34,6 |
| 216 | G*G*T*C*T*CTGTTGGGTCC*C*A*G*G* | 34,9 |
| 217 | G*G*G*A*C*CTGCCTCCAG*A*C*C*C* | 35,2 |
| 218 | C*C*C*A*A*CCCGTACGTCC*C*A*G*C* | 37,4 |
| 219 | G*C*T*T*C*GTCTTCCAGGC*T*G*G*G* | 39 |
| 220 | C*C*G*T*G*TCACCCCTTG*G*T*C*T* | 40,8 |
| 221 | C*T*T*G*G*CTCTCCCAGCG*G*C*A*A* | 40,8 |
| 222 | C*G*G*C*C*TCCTTAGCTGC*T*A*G*A* | 41,7 |
| 223 | C*A*G*G*C*TCCGTGTCACC*C*T*C*T* | 42,8 |
| 224 | G*C*T*C*A*GCCATCCTGGT*T*C*A*A* | 42,9 |
| 225 | C*C*T*G*G*ACTTTGCCTTC*C*C*T*T* | 43,5 |
| 226 | G*T*C*C*C*ACTCTTGTGCC*T*G*G*A* | 44,1 |
| 227 | A*C*C*T*G*GCCACCTCCTG*G*T*T*T* | 45 |
| 228 | T*T*G*G*C*TTTGGCGTTCT*C*G*C*G* | 45,1 |
| 229 | C*G*C*T*T*CCAGTCCCGTC*T*T*T*G* | 46,4 |
| 230 | G*G*T*G*A*TCACCTCTGCC*C*T*C*G* | 46,4 |
| 231 | G*G*T*A*C*CTCCTGCAACC*A*A*C*C* | 47,7 |
| 232 | C*A*C*G*T*GGCTTCCCTC*C*C*A*C* | 49,4 |
| 233 | G*C*G*T*C*CGTGTACCCCT*C*T*T*G* | 50,6 |
| 234 | C*A*C*C*C*TCTTGGTCTG*G*T*G*C* | 52,3 |
| 235 | G*T*C*C*C*AGCGTGATCTT*C*C*A*T* | 52,5 |
| 236 | G*C*C*A*G*CACTGATCACC*C*T*A*A* | 53,1 |
| 237 | T*G*G*T*C*TCTGTTGGTC*C*C*A*G* | 53,6 |

| | | |
|-----|----------------------------------|--------|
| 238 | C*C*G*C*C*TCCCGGCTGGT*G*C*T*T* | 55, 6 |
| 239 | G*G*C*C*A*CACGAGTCCA*G*T*G*T* | 58, 2 |
| 240 | G*T*C*C*C*TCAGGGTTGCC*T*T*T*A* | 58, 5 |
| 241 | G*G*A*C*C*ACTGCCACCTT*C*T*T*G* | 58, 8 |
| 242 | C*A*C*C*T*GGCCACCTCCT*G*G*T*T* | 58, 9 |
| 243 | C*C*C*G*C*CTCCGGCTGG*T*G*C*T* | 59, 7 |
| 244 | G*G*T*G*C*CTTGCCCTTCC*A*T*C*C* | 60, 3 |
| 245 | C*C*C*G*T*CACACTCACAC*A*A*G*G* | 61, 1 |
| 246 | C*C*C*A*A*TCCCTGCTGTG*G*T*C*G* | 61, 4 |
| 247 | G*G*G*T*C*CCACTCTTGTG*C*C*T*G* | 62, 9 |
| 248 | G*C*T*T*C*CAGTCCCCT*T*T*G*C* | 63 |
| 249 | C*C*C*T*T*CTCCCACAGGC*T*G*C*C* | 63, 1 |
| 250 | C*T*G*T*GCCACCACTGA*C*A*A*C* | 63, 2 |
| 251 | G*C*C*A*C*TGCCTCTGTGA*C*A*C*C* | 63, 3 |
| 252 | G*T*G*C*C*ACCACTGACAA*C*C*A*A* | 63, 5 |
| 253 | C*T*T*G*C*CCTTCCATCCT*G*G*T*G* | 63, 7 |
| 254 | G*C*C*T*T*G*GACTTTGCCTT*C*C*C*T* | 64, 3 |
| 255 | G*C*C*T*C*TAACTCCGTGG*C*T*G*C* | 65, 1 |
| 256 | G*A*T*C*C*CAGAGCCTTCC*G*T*A*T* | 66, 3 |
| 257 | C*A*T*C*C*TCGCGCCGCAA*G*C*C*A* | 66, 7 |
| 258 | G*C*C*T*C*CCGGCTGGTGC*T*T*C*A* | 66, 8 |
| 259 | G*T*G*C*C*TGGACTTTGCC*T*T*C*C* | 67, 1 |
| 260 | C*T*G*C*C*ACTGCCCTGTG*T*G*A*C*A* | 69, 7 |
| 261 | C*C*T*G*GCCACCTCCTGG*T*T*T*A* | 70, 3 |
| 262 | G*G*G*T*T*GCCACCTCCTTC*C*A*T*C* | 71, 1 |
| 263 | C*C*A*C*T*CCCACCTCTTG*T*G*C*T* | 71, 8 |
| 264 | G*T*G*C*T*TCAGGCCTTCG*T*C*A*C* | 74, 6 |
| 265 | C*T*G*C*C*AGCTTGCCTTC*T*C*T*T* | 75, 9 |
| 266 | C*T*C*C*C*GGCTGGTGCTT*C*A*G*G* | 76, 2 |
| 267 | C*G*C*C*T*CCCAGCTGGTG*C*T*T*C* | 78 |
| 268 | C*T*G*C*C*CACCTCCTGGT*T*T*A*T* | 78, 7 |
| 269 | G*G*C*C*A*CCTCCTGGTT*A*T*G*A* | 79, 1 |
| 270 | C*C*A*T*C*CTGGTGCCACC*A*C*T*G* | 82, 9 |
| 271 | C*C*T*G*C*CAGCTTGCCTT*C*T*C*T* | 83, 7 |
| 272 | A*A*T*C*C*CTGCTGTGGTC*G*C*A*G* | 83, 7 |
| 273 | G*C*C*A*C*CACTGACAACC*A*A*G*A* | 84, 1 |
| 274 | C*T*T*G*T*CGGCCATGAT*A*T*A*G* | 87, 7 |
| 275 | T*A*A*G*C*AGTGGGTTCTC*T*A*G*T* | 88 |
| 276 | C*C*T*C*C*CGGCTGGTGCT*T*C*A*G* | 88, 8 |
| 277 | C*T*C*C*T*GCCAGCTTGCC*T*T*C*T* | 92, 2 |
| 278 | C*T*T*C*T*CCTCCGGCAC*T*A*G*T* | 93, 6 |
| 279 | C*T*C*C*T*CCGGCCACTAG*T*G*G*G* | 94, 2 |
| 280 | C*C*T*T*C*TCCTCCGGCCA*C*T*A*G* | 94, 9 |
| 281 | G*A*G*C*C*TTCTCCTCCGG*C*C*A*C* | 105, 7 |
| 282 | G*C*C*T*T*CTCCTCCGGC*A*C*T*A* | 112, 5 |
| 283 | C*C*T*T*A*CCTGCTAGCTG*G*C*G*T* | 128, 7 |

8. Нуклеотиды с * имеют модификации 2'-O-MOE; нуклеотиды без * представляют собой 2'-дезоксинуклеозиды. Межнуклеозидными связями являются фосфортиоатные связи.

9. % Остаточной мРНК означает уровень мРНК tau в клетках Huh7, обработанных одной дозой 25

нМ ASO tau в течение 48 ч, по сравнению с уровнем мРНК tau в контрольных клетках HuH7, обработанных PBS.

Пример 7. Ингибиование экспрессии человеческого Tau в клетках SH-SY5Y под действием 5-10-5-гапмеров.

Гапмеры, которые значительно снижают уровень экспрессии мРНК tau, как описано в примере 6, были отобраны и протестиированы в клетках SH-SY5Y. Культивируемые клетки SH-SY5Y подвергали нуклеофекции под действием 2000 нМ антисмыслового олигонуклеотида. После обработки в течение приблизительно 24 ч кДНК непосредственно выделяли из культивированных клеток с использованием мультиплексного набора для клеток Fastlane (Qiagen Cat # 216513). Уровни мРНК tau были измерены с помощью количественной ПЦР в реальном времени с использованием дуплексной ОТ-ПЦР. Были использованы зонды Taqman, специфичные к человеческому MAPT (Lifetech AssayID # Hs00902194_m1: FAM-MGB) и человеческому GAPDH (LifeTech AssayID # Hs02758991_g1: VIC-MGB). Все данные были скорректированы по количеству исходной кДНК, а уровни мРНК tau нормализованы по уровням эндогенного эталонного гена GAPDH. Ген tau и контрольный ген GAPDH амплифицировали в одной и той же реакции ПЦР с аналогичной высокой эффективностью, что позволяло проводить относительную количественную оценку методом ДАСТ. Результаты представлены как процент остаточной мРНК tau по отношению к контрольным клеткам, обработанным PBS. В табл. 10 проиллюстрированы активности отобранных 5-10-5-гапмеров в клетках SH-SY5Y. Величины IC₅₀ для отобранных 5-10-5-гапмеров с 5-метилцитозинами определяли в клетках SH-SY5Y как описано выше, и эти величины представлены в табл. 11.

Таблица 10

Ингибиование мРНК tau под действием 5-10-5-гапмеров в клетках SH-SY5Y

| ASO SEQ ID NO | % Остаточной мРНК ¹⁰ |
|---------------|---------------------------------|
| 204 | 3,0 |
| 205 | 7,6 |
| 202 | 10,7 |
| 203 | 15,3 |
| 208 | 19,2 |
| 207 | 24,6 |
| 209 | 34,3 |
| 210 | 46,9 |
| 206 | 51,4 |
| 211 | 62,1 |
| 201 | 83,2 |

10. % Остаточной мРНК означает уровень мРНК tau в клетках SH-SY5Y, обработанных одной дозой 2000 нМ ASO tau в течение 24 ч, по сравнению с уровнем мРНК tau в контрольных клетках, обработанных PBS.

Таблица 11

IC₅₀ выбранных 5-10-5-гапмеров с 5-метилцитозином в клетках SH-SY5Y

| SEQ ID NO | Последовательность ASO ¹¹ | IC ₅₀ (нМ) |
|-----------|--|-----------------------|
| 284 | ^m C* ^m C*G*T*A* ^m CGT ^m C ^m C ^m CAG ^m CGT*G*A*T* ^m C* | 331 |
| 285 | G*G*T*T*G*A ^m CAT ^m CGT ^m CTG ^m C* ^m C*T*G*T* | 170 |
| 286 | G*G* ^m C*T* ^m C* ^m CAG ^m C ^m CAT ^m C ^m CTG*G*T*T* ^m C* | 268 |
| 287 | G*G* ^m C*T* ^m C* ^m C ^m CA ^m CGG ^m CA*A*G*G*A* | 78 |
| 288 | ^m C* ^m C* ^m C*T* ^m C*TTGGT ^m CTTGGT*G* ^m C*A*T* | 366 |
| 289 | G* ^m C*T*G*G*T ^m CT ^m CTGTTGGG*T* ^m C* ^m C* | 133 |
| 290 | G*T* ^m C* ^m C* ^m C*A ^m CT ^m CTTG ^m C* ^m C*T*G*G*A* | 458 |
| 291 | G*G*G* ^m C*T* ^m CT ^m CT ^m C ^m CATGT ^m C*A*A* ^m C*A* | 118 |

11. Нуклеотиды с * имеют модификацию 2'-О-МОЕ; нуклеотиды без * представляют собой 2'-дезоксинуклеозиды, а ^mC означает 5-метилцитозин. Межнуклеозидными связями являются фосфориоатные связи.

Пример 8. Характеризация антисмылового олигонуклеотида, нацеленного на MAPT.

Антисмыловые олигонуклеотиды, нацеленные на MAPT, были охарактеризованы на оборудовании Thermo Scientific для высокоеффективной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС). Этот метод был применен для подтверждения предполагаемых масс антисмылового олигонуклеотида (ASO) и получения информации о чистоте образца и идентификации основных присутствующих компонентов. Так, например, антисмыловой олигонуклеотид, содержащий SEQ ID NO: 284, имеет структуру,

показанную на фиг. 1А и формулу $C_{23}OH_{321}N_{72}O_{120}P_{19}S_{19}$. Таким образом, предполагаемая молекулярная масса ASO, содержащего SEQ ID NO: 284, составляет приблизительно 7212,3 Да. На фиг. 1В представлена масса пиков для ASO, содержащего SEQ ID NO: 284, как было измерено с помощью ЖХ-МС, и эта масса составляет 7214,3 Да. На фиг. 1С показан пик обратной свертки для ASO, содержащего SEQ ID NO: 284, как было измерено с помощью ЖХ-МС.

Антисмыловый олигонуклеотид, содержащий SEQ ID NO: 285, имеет формулу $C_{230}N_{69}O_{124}P_{19}S_{19}H_{318}$ с предполагаемой молекулярной массой 7231,11 Да. На фиг. 1Д представлена масса пиков для ASO, содержащего SEQ ID NO: 285, как было измерено с помощью ЖХ-МС, и эта масса составляет 7232,5 Да. На фиг. 1Е показан пик обратной свертки для ASO, содержащего SEQ ID NO: 285, как было измерено с помощью ЖХ-МС.

Пример 9. Тестирование *in vivo* гапмеров, нацеленных на MAPT.

Получение мышей, трансгенных по человеческому Tau (hTau).

Векторы ВАС (рBACe3.6), содержащие человеческий ген tau MAPT, были получены из человеческих геномных библиотек, поставляемых компанией Life Technologies. Три вектора, предположительно содержащие все регуляторные области гена MAPT, были подвергнуты скринингу. Человеческую геномную ДНК подвергали стандартной ПЦР для анализа на присутствие каждого экзона и праймеров, охватывающих интроны гена человеческого tau, а регуляторные области также использовали для определения последовательности клонов. Сравнение с человеческой ДНК показало, что один клон (RP11669E14) был интактным для всех частей гена tau. Этот вектор ВАС был использован для получения hTau-трансгенных мышей ВАС. Очищенную ДНК вводили в оплодотворенные эмбрионы мышей C57BL/6. Хвостовую часть ДНК, выделенную у детенышей, гидролизовали рестриктирующими ферментами и гибридизовали с экзон-специфическими зондами с использованием аналогичным образом гибридизованной человеческой ДНК в качестве контроля для анализа на целостность трансгена. Было получено потомство позитивных детенышей. Было получено несколько hTau-трансгенных линий ВАС, и одна линия указывала на экспрессию мРНК и белка человеческого MAPT (фиг. 2A-2C). Эта линия экспрессировала все шесть транскриптов и изоформ белков, присутствующих в человеческом головном мозге (фиг. 2A-2C). Гетерозиготные hTau-трансгенные мыши ВАС несут одну копию трансгена и имеют уровни экспрессии РНК и белка человеческого tau, сравнимые с уровнем экспрессии эндогенного мышного Tau.

In vitro ингибирование человеческого Tau под действием антисмыловых олигонуклеотидов.

Отобранные антисмыловые олигонуклеотиды были протестиированы *in vivo*. Группам из пяти hTau-трансгенных мышей ВАС вводили 1, 10, 50, 200 или 400 мкг отобранного антисмылового олигонуклеотида с помощью интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV) ударной дозы, а группу контрольных мышей не обрабатывали. Все процедуры проводили под анестезией изофлураном в соответствии с требованиями IACUC. Для ICV-инъекции ударной дозы антисмыловой олигонуклеотид вводили в правый боковой желудочек hTau-трансгенных мышей ВАС. Затем инъецировали два или четыре микролитра раствора PBS, содержащего 100 мкг/мкл олигонуклеотида. Ткани собирали непосредственно через 1 ч, 4 ч, 24 ч, 2 недели, 4 недели, 12 недель или 24 недели после введения олигонуклеотида. РНК экстрагировали из гиппокампа или коры головного мозга и оценивали на экспрессию мРНК человеческого tau с помощью ПЦР-анализа в реальном времени. Уровни мРНК человеческого tau оценивали как описано выше. Результаты вычисляли как процент ингибирования экспрессии мРНК человеческого tau, нормализованный по уровням GAPDH по сравнению с контрольными необработанными мышами. Белок экстрагировали из гиппокампа или коры головного мозга и оценивали на уровень экспрессии белка человеческого tau с помощью ELISA, а затем нормализовали по уровню общего белка.

In vivo активность 5-10-5-гапмеров, содержащих SEQ ID NO: 284 или SEQ ID NO: 285, была протестирована методами, описанными выше. Как показано в табл. 12, оба антисмыловых олигонуклеотида в значительной степени ингибировали экспрессию мРНК человеческого tau в коре головного мозга и в гиппокампе через 2 недели после одной ICV-инъекции антисмыловых олигонуклеотидов. Ингибирование мРНК человеческого tau составляло приблизительно 65% в коре головного мозга и гиппокампе для гапмеров, содержащих SEQ ID NO: 285. Ингибирование мРНК человеческого tau составляло приблизительно 42% в коре головного мозга и в гиппокампе для гапмеров, содержащих SEQ ID NO: 284. Что касается уровня белка tau через 2 недели после ASO-обработки, то было обнаружено, что гапмер, содержащий SEQ ID NO: 285, ингибировал экспрессию белка tau в коре головного мозга приблизительно на 50%; а гапмер, содержащий SEQ ID NO: 284, ингибировал экспрессию белка tau в коре головного мозга приблизительно на 36%. Авторами не было обнаружено какого-либо значимого снижения уровня белка tau в гиппокампе через две недели после ASO-обработки.

Таблица 12

Ингибирование экспрессии мРНК и белка Tau под действием 5-10-5-МОЕ-гапмеров *in vivo*

| ASO SEQ ID NO | % Остаточной мРНК tau через две недели после ASO-обработки ¹² | | % Остаточного белка tau через две недели после ASO-обработки ¹³ | |
|---------------|--|-----------|--|-----------|
| | Кора головного мозга | Гиппокамп | Кора головного мозга | Гиппокамп |
| 285 | 35,26 | 33,55 | 50,8 | 91,1 |
| 284 | 58,8 | 56,77 | 64 | 100 |

12. % Остаточной мРНК tau означает уровень мРНК tau в указанной ткани головного мозга hTau-трансгенных мышей ВАС через две недели после одной ICV-инъекции указанного ASO по сравнению с уровнем мРНК tau в соответствующей ткани головного мозга контрольных hTau-трансгенных мышей ВАС, которые не были обработаны ASO.

13. % Остаточного белка tau означает уровень белка tau в указанной ткани головного мозга hTau-трансгенных мышей ВАС через две недели после одной ICV-инъекции указанного ASO по сравнению с уровнем белка tau в соответствующей ткани головного мозга контрольных hTau-трансгенных мышей ВАС, которые не были обработаны ASO.

Уровни мРНК и белка tau также тестировали через 4 недели после одной ICV-инъекции гапмеров. Антисмыловые олигонуклеотиды, содержащие SEQ ID NO: 285, в значительной степени ингибировали экспрессию мРНК (фиг. 2D) и белка (фиг. 2E) человеческого tau в головном мозге. Ингибирование мРНК человеческого tau составляло приблизительно 60% в коре головного мозга и в гиппокампе для гапмера, содержащего SEQ ID NO: 285 (фиг. 2D, данные не приводятся). Вестерн-блот-анализ показал, что гапмер, содержащий SEQ ID NO: 285, ингибировал уровень белка человеческого tau приблизительно на 50% в гиппокампе через 4 недели после обработки (фиг. 2E).

Для детектирования распределения антисмыловых олигонуклеотидов в головном мозге hTau-трансгенных мышей ВАС проводили эксперименты по гибридизации *in situ* с использованием зонда на основе блокированной нукleinовой кислоты, меченной двумя молекулами дигоксигенина (DIG) (LNA™, Exiqon). Зонды LNA с двойной DIG-меткой, комплементарные антисмыловым олигонуклеотидам-мишням, гибридизовали в течение ночи. Затем зонды детектировали с использованием овечьего анти-DIG антитела, коньюгированного с щелочной фосфатазой (Roche Diagnostics, Cat. # 11093274910), и проводили колориметрическую реакцию с использованием нитротетразолиевого синего, связанного со щелочной фосфатазой, субстратом которой является 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат (BCIP). Распределение антисмылового олигонуклеотида SEQ ID NO: 285 в головном мозге, оцениваемое в репрезентативном эксперименте, проиллюстрировано на фиг. 3, где показана начальная диффузия ASO из желудочек в паренхиму мышиного головного мозга, при этом сигнал распределения не изменялся за период времени от 24 ч до 2 недель (фиг. 3). Антисмыловый олигонуклеотид оставался стабильным в головном мозге даже через 4 недели (данные не приводятся).

Наблюдалось дозозависимое ингибирование экспрессии мРНК (фиг. 4A) и белка (фиг. 4B) человеческого tau у hTau-трансгенных мышей ВАС под действием антисмылового олигонуклеотида SEQ ID NO: 285 (фиг. 4A и 4B).

Мониторинг длительности уровня экспрессии мРНК (фиг. 5A) и белка (фиг. 5B) человеческого tau у hTau-трансгенных мышей ВАС после одной ICV-инъекции 200 мкг антисмылового олигонуклеотида SEQ ID NO: 285 указывал на длительное ингибирование экспрессии мРНК и белка tau вплоть до 12 недель под действием антисмылового олигонуклеотида SEQ ID NO: 285 (фиг. 5A и 5B).

Пример 10. Ингибирование экспрессии человеческого Tau в клетках Huh7 и SH-SY5Y под действием дополнительных 5-10-5-гапмеров, содержащих 5-метилцитозин.

Дополнительные последовательности гапмеров с 5-метилцитозином, нацеленные на tau, были проанализированы на ингибирование экспрессии человеческой мРНК tau *in vitro* в клетках Huh7 и SH-SY5Y, как описано выше. Результаты представлены как процент остаточной мРНК tau по отношению к контрольным клеткам, обработанным PBS. В табл. 13 указаны активности дополнительных скринированных последовательностей 5-10-5-гапмеров в клетках Huh7 и SH-SY5Y.

Таблица 13

Ингибирование мРНК Tau под действием 5-10-5-MOE-гапмеров в клетках HuH7 и SH-SY5Y

| SEQ ID NO | Последовательность ASO ¹⁴ | % Остаточной мРНК в клетках SHSY5Y ¹⁵ | % Остаточной мРНК в клетках HuH7 ¹⁶ |
|--------------|---|--|--|
| 307 | G*mC*mC*mC*T*TmCTGGmCmCTGGA*G*G *G*G* | 66,8 | 34,7 |
| 308 | T*G*G*mC*mC*mCTTmCTGGmCmCTG*G*A *G*G* | 57,7 | 41,1 |
| 309 | G*mC*T*G*G*TmCTTmCAGGTT*mC*T*m C*A* | 60,4 | 42,7 |
| 310 | T*mC*A*G*G*TmCAAmCTGGTTT*G*T*A *G* | 30,5 | 37,3 |
| 311 | T*G*mC*T*mC*AGGTmCAAmCTGG*T*T* T*G* | 42,6 | 35,5 |
| 312 | T*T*G*mC*T*mCAGGTmCAAmCTG*G*T* T*T* | 44,9 | 44,7 |
| 313 | mC*mC*T*T*G*mCTmCAGGTmCAA*mC*T*G *G*T* | 10,3 | 20,9 |
| 314 | mC*mC*mC*T*mC*TTmCTAmCATGGA*G*G *G*G* | 67,7 | 51,3 |
| 315 | mC*T*mC*T*mC*mCmCTmCTTmCTAmCA*T* G*G*A* | 76,7 | 95,1 |
| 316 | mC*T*T*mC*T*mC*mCmCTmCTTmCTAmC*A* T*G*G* | 68,2 | 77,6 |
| 317 | mC*mC*T*T*mC*mCmCTmCTTmCTAmC *A*T*G* | 50,4 | 72,3 |
| 318 | mC*A*A*A*TmCmCTTGTTGmCT*G*mC* mC*A* | 33,6 | 54,4 |
| 319 | T*mC*A*A*A*TmCmCTTGTTGmC*T*G*m C*mC* | 28,5 | 44,5 |
| 320 | T*G*G*mC*T*mCmCAmCGAAmCAmCA*mC*m C*A*A* | 24,2 | 55,1 |
| 321 | G*T*G*G*mC*TmCmCAmCGAAmCAmC*A*m C*mC*A* | 22,9 | 51,6 |

| | | | |
|-----|--|-------|-------|
| 322 | T*T G*T G*G*mCTmCmCAmCGAAmCA*mC*A *mC*mC* | 25, 4 | 62, 4 |
| 323 | mC*T*T G*T G*mCTmCmCAmCGAAmC*A*m C*A*mC* | 31, 1 | 49, 2 |
| 324 | mC*mC*T*T G*T GG*mCTmCmCAmCGAA*mC* A*mC*A* | 34, 8 | 56, 7 |
| 325 | G*mC*mC*T*T GGG*mCTmCmCAmCGA*A*m C*A*mC* | 31, 4 | 51, 3 |
| 326 | T*T G*mC*mC*T*T GTGG*mCTmCmCAmCG*A*A *mC*A* | 24, 2 | 50, 2 |
| 327 | mC*T*T G*mC*mC*TGTGG*mCTmCmCAmC*G* A*A*mC* | 18, 9 | 56, 7 |
| 328 | T*mC*T*T G*mC*mCTGTGG*mCTmCmCA*mC* G*A*A* | 25, 0 | 43, 7 |
| 329 | G*T*mC*T*T G*mC*mCTGTGG*mCTmCmC*A*m C*G*A* | 10, 1 | 35, 5 |
| 330 | mC*T*mC*T*T G*mC*mCTGTGG*mCTmC*mC* A*mC*G* | 12, 6 | 37, 9 |
| 331 | T*mC*T*mC*T*mC*mCTGTGG*mCT*mC*m C*A*mC* | 9, 1 | 44, 6 |
| 332 | A*T*mC*G*T*mCTG*mCTGTGG*mCT*mC *mC*A* | 18, 8 | 55, 4 |
| 333 | mC*A*T*mC*G*T*mCTG*mCTGTGG*mC*T *mC*mC* | 17, 1 | 62, 3 |
| 334 | A*mC*A*T*mC*GT*mCTG*mCTGTGG*mC *T*mC* | 14, 3 | 57, 7 |
| 335 | G*A*mC*A*T*mCGT*mCTG*mCTGT*G*G* mC*T* | 11, 7 | 33, 5 |
| 336 | T*T G*A*mC*A*T*mCGT*mCTG*mCTG*T*G* G*mC* | 15, 2 | 38, 4 |
| 337 | T*T G*A*mC*AT*mCGT*mCTG*mCTG*T*G* G*G* | 26, 2 | 43, 3 |
| 338 | G*T*T G*A*mCAT*mCGT*mCTG*mC*T*G* T*G* | 18, 0 | 44, 5 |
| 285 | G*G*T*T G*A*mCAT*mCGT*mCTG*mC*mC*T* G* | 17, 2 | 42, 7 |

| | | | |
|-----|---|-------|-------|
| | G*T* | | |
| 339 | A*G*G*T*T*GA ^m CAT ^m CGT ^m CTG* ^m C* ^m C* | 23, 4 | 48, 9 |
| 340 | T*G* | | |
| 340 | A*A*G*G*T*TGA ^m CAT ^m CGT ^m CT*G* ^m C* ^m | 17, 2 | 38, 6 |
| 341 | C*T* | | |
| 341 | ^m C*A*A*G*G*TTGA ^m CAT ^m CGT ^m C*T*G* ^m | 25, 7 | 47, 4 |
| 342 | C* ^m C* | | |
| 342 | A*mC*A*A*G*GTTGA ^m CAT ^m CGT* ^m C*T* | 24, 3 | 43, 0 |
| 343 | G*mC* | | |
| 343 | ^m C*A*mC*A*A*GGTTGA ^m CAT ^m CG*T* ^m C* | 28, 9 | 52, 9 |
| 344 | T*G* | | |
| 344 | A*mC*A*mC*A*AGGTTGA ^m CAT ^m C*G*T* ^m | 23, 0 | 51, 4 |
| 345 | C*T* | | |
| 345 | ^m C*A*mC*A*mC*AAGGTTGA ^m CAT* ^m C*G* | 33, 5 | 78, 2 |
| 346 | T*mC* | | |
| 346 | T*mC*A*mC*A*mCAAGGTTGA ^m CA*T* ^m C* | 44, 4 | 60, 4 |
| 347 | G*T* | | |
| 347 | ^m C*T*mC*A*mC*A ^m CAAGGTTGA ^m C*A*T* | 35, 4 | 67, 6 |
| 348 | ^m C*G* | | |
| 348 | A*mC*T*mC*A*mCA ^m CAAGGTTGA* ^m C*A* | 61, 9 | 66, 1 |
| 349 | T*mC* | | |
| 349 | ^m C*A*mC*T*mC*A ^m CA ^m CAAGGTTG*A*mC | 67, 3 | 72, 0 |
| 350 | *A*T* | | |
| 350 | A*mC*A*mC*T*mCA ^m CA ^m CAAGGTTG*G*A* | 64, 0 | 72, 7 |
| 351 | ^m C*A* | | |
| 351 | ^m C*A*mC*A*mC*T ^m CA ^m CA ^m CAAGGTTG*T*G | 46, 3 | 64, 8 |
| 352 | *A*mC* | | |
| 352 | T*mC*A*mC*A*mCT ^m CA ^m CA ^m CAAGG*T*T | 55, 9 | 73, 2 |
| 353 | *G*A* | | |
| 353 | G*T*mC*A*mC*A ^m CT ^m CA ^m CA ^m CAAGG*G*T | 31, 9 | 53, 3 |
| 354 | *T*G* | | |
| 354 | ^m C*G*T*mC*A*mCA ^m CT ^m CA ^m CA ^m CAA*G* | 29, 1 | 57, 6 |
| 355 | G*T*T* | | |
| 355 | ^m C*mC*G*T*mC*A ^m CA ^m CT ^m CA ^m CA ^m CA*A* | 33, 5 | 57, 7 |
| 355 | G*G*T* | | |

| | | | |
|-----|--|-------|-------|
| 356 | $mC^*mC*mC*mC*G*TmCA^mCA^mCT^mCA^mCA^m$ $C^*A^*A^*G^*$ | 33, 3 | 70, 1 |
| 357 | $mC^*mC*mC*T*T*mCT^mC^mCA^mCAGG^mC*T$ $*G^*mC*mC^*$ | 40, 3 | 65, 4 |
| 358 | $mC^*A^*T*mC^*A^*AGGT^mCAGT^mCTT*T*T*m$ C^*T^* | 43, 5 | 61, 8 |
| 359 | $mC^*mC*A^*A^*mC^*mCTT^mCAGAA^mCT^mC^*A^*$ $A^*T^*A^*$ | 30, 7 | 71, 0 |
| 360 | $T^*mC^*mC^*A^*A^*mC^*mCTT^mCAGAA^mCT^*mC^*$ $A^*A^*T^*$ | 30, 7 | 77, 6 |
| 361 | $T^*T^*mC^*mC^*A^*A^*mC^*mCTT^mCAGAA^mC^*T^*m$ $C^*A^*A^*$ | 29, 7 | 66, 5 |
| 362 | $G^*T^*T^*mC^*mC^*AA^mC^*mCTT^mCAGAA^mC^*T$ $*mC^*A^*$ | 22, 9 | 72, 7 |
| 363 | $A^*G^*T^*T^*mC^*mCAA^mC^*mCTT^mCAGA^*A^*mC$ $*T^*mC^*$ | 47, 6 | 66, 5 |
| 364 | $mC^*A^*G^*T^*T^*mC^*mCAA^mC^*mCTT^mCAG^*A^*A$ $*mC^*T^*$ | 63, 6 | 70, 0 |
| 365 | $G^*mC^*A^*G^*T^*T^*mC^*mCAA^mC^*mCTT^mCA^*G^*A$ $*A^*mC^*$ | 28, 6 | 47, 6 |
| 366 | $G^*T^*mC^*mC^*mC^*AGGT^mCTG^mCAA^*G^*T^*$ G^*G^* | 18, 1 | 41, 7 |
| 367 | $A^*A^*G^*T^*mC^*mC^*mC^*mCAGGT^mCTG^mCA^*A^*A^*$ G^*T^* | 48, 5 | 68, 1 |
| 368 | $A^*A^*A^*G^*T^*mC^*mC^*mCAGGT^mCTG^mC^*A^*A^*$ A^*G^* | 53, 0 | 73, 7 |
| 369 | $G^*G^*mC^*A^*mC^*mC^*AA GT^mC^*mCTTA^mCA^*A^*A^*$ G^*A^* | 43, 7 | 80, 9 |
| 370 | $A^*G^*G^*mC^*A^*mCAAGT^mC^*mCTTA^mC^*A^*A^*$ A^*G^* | 41, 8 | 76, 8 |
| 371 | $T^*mC^*A^*mC^*mC^*mCT^mCAGTATGG^*A^*G^*T^*$ A^*G^* | 35, 8 | 67, 9 |
| 372 | $T^*T^*mC^*A^*mC^*mC^*mCT^mCAGTATGG^*A^*G^*$ T^*A^* | 35, 7 | 58, 3 |
| 373 | $T^*T^*T^*mC^*A^*mC^*mC^*mCT^mCAGTATG^*G^*A^*$ | 33, 9 | 65, 5 |

| | | | |
|-----|-----------------------------------|------|------|
| | G*T* | | |
| 374 | A*T*T*T*mC*A*mCmCmCTmCAGTAT*G*G* | 51,1 | 54,0 |
| 375 | A*A*T*T*T*mCAmCmCmCTmCAGTA*T*G* | 86,4 | 67,7 |
| 376 | mC*mC*T*T*A*ATTTmCAmCmCmCTmC*A* | 35,6 | 72,8 |
| 377 | mC*mC*mC*T*T*AATTTmCAmCmCmCT*mC* | 32,4 | 60,4 |
| 378 | T*mC*mC*mC*T*TAATTTmCAmCmCmC*T*m | 26,7 | 71,7 |
| 379 | T*T*mC*mC*mC*TTAATTTmCAmCmC*mC* | 20,4 | 73,9 |
| 380 | mC*T*T*mC*mC*mCTTAATTTmCAmC*mC*m | 28,1 | 86,4 |
| 381 | A*mC*T*mC*T*TGTGmCmCTGGAmC*T*T* | 32,4 | 44,6 |
| 382 | mC*A*mC*T*mC*TTGTGmCmCTGGAmC*T*T | 33,4 | 58,2 |
| 383 | mC*mC*A*mC*T*mCTTGTGmCmCTGG*A*m | 26,8 | 68,5 |
| 384 | mC*mC*mC*A*mC*T*mCTTGTGmCmCTGG*G* | 16,5 | 43,4 |
| 385 | T*mC*mC*mC*A*mCTmCTTGTGmCmCT*G* | 10,6 | 38,9 |
| 386 | G*T*mC*mC*mC*A*mCTmCTTGTGmCmC*T* | 23,0 | 37,4 |
| 387 | G*G*T*mC*mC*mCAmCTmCTTGTGmC*mC* | 31,0 | 36,9 |
| 388 | G*G*G*T*mC*mC*mCAmCTmCTTGTGmC*mC* | 45,9 | 47,5 |
| 389 | G*T*G*mC*mC*mCTGGmCTmCAmCAT*mC* | 42,8 | 81,7 |
| 390 | A*G*T*G*mC*mCmCTGGmCTmCAmCA*T*m | 28,1 | 51,0 |

| | | | |
|-----|--|-------|-------|
| 391 | ^m C*A*G*T*G ^m C ^m CTGG ^m CT ^m CA ^m C*A* T ^m C*T* | 49, 1 | 85, 8 |
| 392 | G ^m C*A*G*T*G ^m C ^m CTGG ^m CT ^m CA ^m C* A*T ^m C* | 34, 4 | 65, 8 |
| 393 | A*G ^m C*A*G*TG ^m C ^m CTGG ^m CT ^m C*A* C*A*T* | 40, 5 | 72, 6 |
| 394 | T*G*A*G ^m C*AGTGC ^m C ^m CTGG ^m C*T ^m C *A*T ^m C* | 91, 8 | 57, 9 |
| 395 | G ^m C*A*T*G ^m CTT ^m C ^m CAG ^m CTG*G*G* A*T ^m C* | 38, 5 | 60, 3 |
| 396 | A*G ^m C*T*G ^m CT ^m C ^m CAG ^m CAGAA ^m C*A *G*A* | 80, 8 | 78, 5 |
| 397 | T*A*T*A*T*GTT ^m CAG ^m CTG ^m CT ^m C*A* A*G* | 89, 9 | 63, 2 |
| 398 | G*T*A*T*A*TGT ^m CAG ^m CTG ^m C*T ^m C* C*A* | 55, 2 | 64, 3 |
| 399 | T*G*T*A*T*ATGTT ^m CAG ^m CTG* ^m C*T ^m C*mC* | 59, 9 | 74, 6 |
| 400 | G ^m C*A*G*G ^m CAA ^m CAT ^m CTAT*G*T* A*T* | 58, 3 | 73, 2 |
| 401 | G*G ^m C*A*G*GG ^m CAA ^m CAT ^m CTA*T*G* T*A* | 61, 5 | 74, 5 |
| 402 | G*G ^m C*A*GGG ^m CAA ^m CAT ^m CT* G*T* | 48, 1 | 68, 0 |
| 403 | T ^m C*A ^m C*T ^m CTGGTGAAT ^m C*C*A*A* G*mC* | 21, 9 | 54, 5 |
| 404 | G*T ^m C*A ^m C*T ^m CTGGTGAAT ^m C*C*A* A*G* | 13, 8 | 61, 3 |
| 405 | A*G*T ^m C*A ^m CT ^m CTGGTGAAT ^m C*C* A*A* | 15, 1 | 55, 2 |
| 406 | T*A*G*T ^m C*A ^m CT ^m CTGGTGAAT ^m C*C* C*A* | 36, 7 | 70, 9 |
| 407 | A*T*A*G*T ^m CA ^m CT ^m CTGGTGA*A*T* C*mC* | 42, 4 | 76, 6 |
| 408 | ^m C*A*T*A*G*T ^m CA ^m CT ^m CTGGTGA*A*A* C*mC* | 57, 0 | 77, 2 |

| | | | |
|-----|--|------|------|
| | T*mC* | | |
| 409 | T*mC*A*T*A*GTmCA^CTmCTGGT*G*A* A*T* | 45,8 | 65,5 |
| 410 | mC*T*G*G*T*mCTmCTGTTGGGT*mC*mC* mC*A* | 37,2 | 60,5 |
| 411 | A*T*mC*mC*T*GTGmCTTmCAGGmC*mC*T *T*mC* | 31,2 | 66,6 |
| 412 | A*A*T*mC*mC*T*TGTGmCTTmCAGG*mC*mC *T*T* | 41,2 | 73,5 |
| 413 | mC*T*A*A*T*mCmCTGTGmCTTmCA*G*G* mC*mC* | 38,7 | 65,1 |
| 414 | mC*mC*T*A*A*TmCmCTGTGmCTTmC*A*G *G*mC* | 31,9 | 64,8 |
| 415 | T*mC*mC*T*A*ATmCmCTGTGmCTT*mC*A *G*G* | 45,9 | 73,6 |
| 416 | G*T*mC*mC*T*AATmCmCTGTGmCT*T*mC *A*G* | 50,0 | 80,9 |
| 417 | A*G*T*mC*mC*TAATmCmCTGTGmC*T*T* mC*A* | 51,9 | 77,1 |
| 418 | mC*A*G*T*mC*mCTAATmCmCTGTG*mC*T *T*mC* | 53,2 | 68,4 |
| 419 | T*mC*A*G*T*mCmCTAATmCmCTGT*G*mC *T*T* | 58,9 | 78,3 |
| 420 | T*T*mC*A*G*TmCmCTAATmCmCTG*T*G* mC*T* | 51,1 | 72,9 |
| 421 | mC*T*T*mC*A*GTmCmCTAATmCmCT*G*T *G*mC* | 49,4 | 69,1 |
| 422 | G*mC*T*T*mC*AGTmCmCTAATmCmC*T*G *T*G* | 39,5 | 56,8 |
| 423 | G*G*A*G*T*TGTAAAGmCmCTmCmC*T*T* T*G* | 61,8 | 66,4 |
| 424 | G*mC*T*mC*T*GGTmCAAGGmCTT*T*G* G*G* | 33,8 | 49,8 |
| 425 | T*G*mC*T*mC*TGGTmCAAGGmCT*T*T* G*G* | 37,9 | 55,5 |

| | | | |
|-----|---|-------|-------|
| 426 | G*T*G*mC*T*mCTGGT*mCAAGG*mC*T*T* T*G* | 48, 0 | 74, 1 |
| 427 | G*G*T*G*mC*T*mCTGGT*mCAAGG*mC*T* T*T* | 51, 4 | 68, 7 |
| 428 | T*G*A*G*G*TG*mCT*mCTGGT*mCA*A*G*G *mC* | 38, 0 | 72, 9 |
| 429 | T*T*T*mC*T*mCATGG*mCAG*mCAG*A*T* G*G* | 87, 5 | 84, 7 |
| 430 | T*G*mC*T*G*AGTTT*mCTTTAG*G*mC*A *G* | 61, 8 | 94, 7 |
| 431 | mC*T*G*mC*T*GAGTTT*mCTTTA*G*G*m C*A* | 51, 5 | 61, 1 |
| 432 | G*mC*T*G*mC*TGAGTTT*mCTTT*A*G*G *mC* | 46, 5 | 94, 4 |
| 433 | G*G*mC*T*G*mCTGAGTTT*mCTT*T*A*G *G* | 61, 8 | 80, 4 |
| 434 | A*G*G*mC*T*G*mCTGAGTTT*mCT*T*T*A *G* | 68, 1 | 74, 7 |
| 435 | G*A*G*G*mC*TG*mCTGAGTTT*mC*T*T*T *A* | 52, 3 | 83, 7 |
| 436 | T*G*A*A*G*mCTG*mCTGAGTTT*mC*T*T *T* | 62, 3 | 71, 5 |
| 437 | mC*T*G*mC*mC*AAGT*mC*mCT*mCAG*G* G*T*T* | 43, 3 | 74, 6 |
| 438 | A*mC*T*G*mC*mCAAGT*mC*mCT*mCA*G* G*G*T* | 53, 4 | 78, 8 |
| 439 | T*A*mC*T*G*mC*mCAAGT*mC*mCT*mC*A* G*G*G* | 34, 5 | 74, 9 |
| 440 | mC*T*A*mC*T*G*mCTGGT*mC*mC*mCT*mC* A*G*G* | 35, 4 | 73, 6 |
| 441 | T*mC*T*A*mC*T*G*mCAAGT*mC*mC*mC*T*m C*A*G* | 65, 7 | 84, 0 |
| 442 | T*T*mC*T*A*mCTG*mCAAGT*mC*mC*mC* T*mC*A* | 47, 9 | 93, 1 |
| 443 | T*T*T*mC*T*A*mCTG*mCAAGT*mC*mC*m T*mC* | 53, 6 | 85, 3 |

| | | | |
|-----|---|-------|--------|
| | C*T*mC* | | |
| 444 | A*T*T*T*mC*TA^CTGmCmCAAGT*mC*mC *mC*T* | 72, 4 | 100, 6 |
| 445 | G*A*T*T*T*mCTA^CTGmCmCAAG*T*mC* mC*mC* | 68, 6 | 79, 7 |
| 446 | G*G*A*T*T*T*mCTA^CTGmCmCAA*G*T*m C*mC* | 72, 1 | 88, 6 |
| 447 | T*G*G*A*T*T*mCTA^CTGmCmCA*A*G* T*mC* | 65, 7 | 79, 7 |
| 448 | mC*T*G*G*A*TTT*mCTA^CTGmCmC*A*A* G*T* | 51, 0 | 68, 6 |
| 449 | A*T*mC*T*T*AGGmCTGGmCmCmC*A*A *G*A* | 43, 6 | 74, 1 |
| 450 | T*G*A*T*mC*TTAGGmCTGGmCmC*mC*mC *A*A* | 38, 8 | 70, 0 |
| 451 | T*T*T*A*T*mCTGmCmCAGmCA^CT*G*A* T*mC* | 51, 0 | 76, 2 |
| 452 | A*T*T*A*T*mCTGmCmCAGmCA^C*T*G* A*T* | 55, 2 | 77, 7 |
| 453 | A*A*T*T*T*AT*mCTGmCmCAGmCA*mC*T* G*A* | 68, 1 | 71, 1 |
| 454 | T*A*T*A*T*mCTAT*mCTAGmCmC*mC*A *mC*mC* | 60, 1 | 88, 2 |
| 455 | G*T*A*T*A*T*mCTAT*mCTAGmCmC*mC *A*mC* | 64, 2 | 85, 2 |
| 456 | A*G*T*A*T*AT*mCTAT*mCTAG*mC*mC *C*A* | 62, 8 | 86, 2 |
| 457 | A*A*mC*mC*mC*mCAAGGGmCmCT*mCT*A* A*mC*T* | 83, 3 | 90, 7 |
| 458 | G*mC*A*A*mC*mCAGATGTmCmCAT*A*T* T*mC* | 50, 9 | 87, 2 |
| 459 | G*G*mC*T*T*AGGA^CmCmCTGA*A*A* G*A* | 59, 8 | 71, 1 |
| 460 | G*G*mC*A*T*GATTGTGGG^CT*T*A*G* G* | 32, 3 | 51, 6 |

| | | | |
|-----|--|------|------|
| 461 | A*G*G*mC*A*TGATTGTGGG ^m C*T*T*A* G* | 31,0 | 60,2 |
| 462 | G*T*A*A*mC*mC ^m CTTTT ^m CAAAG*mC*T* G*A* | 50,2 | 63,6 |
| 463 | G*G*T*A*A*mC ^m C ^m CTTTT ^m CAAAG*mC* T*G* | 27,1 | 51,9 |
| 464 | G*G*G*T*A*A ^m C ^m C ^m CTTTT ^m CAA*A*G* ^m C*T* | 45,6 | 64,5 |
| 465 | A*G*G*G*T*A ^m C ^m C ^m CTTTT ^m CA*A*A* G*mC* | 60,3 | 61,5 |
| 466 | ^m C*A*G*G*G*TA ^m C ^m C ^m CTTTT ^m C*A*A* A*G* | 59,2 | 82,8 |
| 467 | ^m C*mC*A*G*G*GTAA ^m C ^m C ^m CTTTT ^m C*A* *A*A* | 48,5 | 57,9 |
| 468 | ^m C*mC*mC*A*G*GGTAA ^m C ^m C ^m CTTT ^m T* C*A*A* | 37,8 | 70,2 |
| 469 | G*mC*mC*mC*A*GGTAA ^m C ^m C ^m CTT*T* *mC*A* | 31,9 | 58,2 |
| 470 | T*G*mC*T*mC*AA ^m CATGG ^m CAA*mC*T* ^m C*A* | 42,1 | 70,5 |
| 471 | T*mC*mC*T*G*mCT ^m CAA ^m CATGG ^m C*A*A* *A*mC* | 45,2 | 77,7 |
| 472 | G*T*mC*mC*T*G*mCT ^m CAA ^m CATGG*mC*A* *A*A* | 42,9 | 64,0 |

14. Нуклеотиды с * имеют модификацию 2'-О-МОЕ; нуклеотиды без * представляют собой 2'-дезоксинуклеозиды, а ^mC означает 5-метилцитозин. Межнуклеозидными связями являются фосфориоатные связи.

15. % Остаточной мРНК означает уровень мРНК tau в клетках SH-SY5Y, обработанных одной дозой 2000 нМ ASO tau в течение 24 ч, по сравнению с уровнем мРНК tau в контрольных клетках, обработанных PBS.

16. % Остаточной мРНК означает уровень мРНК tau в клетках Huh7, обработанных одной дозой 25 нМ ASO tau в течение 48 ч, по сравнению с уровнем мРНК tau в контрольных клетках, обработанных PBS.

Гапмеры, которые в значительной степени снижают экспрессию мРНК tau, как показано в табл. 13, были отобраны и протестированы в клетках SH-SY5Y. Величины IC₅₀ отобранных 5-10-5-гапмеров с 5-метилцитозинами определяли в клетках SH-SY5Y, как описано выше, и результаты представлены в табл. 14.

Таблица 14

 IC_{50} отобранных 5-10-5-гапмеров с 5-метилцитозином в клетках SH-SY5Y

| SEQ ID NO | Последовательность ASO ¹⁷ | IC_{50} (нМ) |
|-----------|---|-------------------|
| 313 | $mC^mC^T*T^G*mCTmCAGGTmCAA^mC^T*G^G*T^*$ | 1115 |
| 327 | $mC^T*G*mC^mC^TGTGGmCTmCmCA^mC^G^A^A*mC^*$ | 844 |
| 329 | $G*T^mC^T*T^G*mC^mCTGTGGmCTmC^mC^A*mC^G^A^*$ | 481 |
| 330 | $mC^G*T^mC^T*mC^T*mC^mCTGTGGmCTmC^mC^A*mC^G^*$ | 555 |
| 331 | $T*mC^G*T*mC^T*mC^T*mC^mCTGTGGmCT*mC^mC^A*mC^*$ | 818 |
| 332 | $A^mT*mC^G*T*mCTGmC^mCTGTGGmC^T*mC^mC^A^*$ | 918 |
| 333 | $mC^A^T*mC^G*T*mCTGmC^mCTGTGGmC^T*mC^mC^mC^*$ | 981 |
| 334 | $A^mC^A^T*mC^G*T*mCTGmC^mCTGTGGmC^T*mC^mC^*$ | 608 |
| 335 | $G^A^mC^A^T*mCGTmCTGmC^mCTGTG^T*mG^G*mC^T^*$ | 414 |
| 336 | $T^G^A^mC^A^T*mCGTmCTGmC^mCTGTG^T*mG^G*mC^*$ | 393 |
| 338 | $G^T^G^A^mC^A^T*mCATmCGTmCTGmC^mC^T*mG^G^T^G^*$ | 588 |
| 340 | $A^A^G^G^G^T*mTGA^mCATmCGTmCT^G*mC^mC^T^*$ | 496 |
| 366 | $G^T*mC^mC^mC^A^mC^T*mCTTGTGmCTG^G^A^mC^T^*$ | 793 |
| 384 | $mC^mC^mC^A^mC^T*mCTTGTGmCTG^G^A^mC^T^*$ | 810 |
| 385 | $T*mC^mC^mC^A^mC^T*mCTTGTGmCTG^G^A^mC^T^*$ | 954 |
| 404 | $G^T*mC^A^mC^A^mC^T*mCTGGTGAATmC^mC^A^A^G^*$ | 12035 |
| 405 | $A^G^T*mC^A^mC^A^mC^T*mCTGGTGAAT*mC^mC^A^A^*$ | 743 |
| 381 | $A^mC^T*mC^T*mC^T*mTGTGmC^mCTGGA^mC^T*mT^G^*$ | 2737 |

17. Нуклеотиды с * имеют модификацию 2'-О-MOE; нуклеотиды без * представляют собой 2'-дезоксинуклеозиды, а mC означает 5-метилцитозин. Межнуклеозидными связями являются фосфортиоатные связи.

Пример 11. Ингибирование экспрессии обезьяньего и человеческого tau под действием антисмысловых олигонуклеотидов с 5-метилцитозином.

Некоторые гапмеры, которые значительно снижают экспрессию мРНК tau, отбирали и тестировали в клетках зеленых мартышек Cos1. Результаты представлены как процент остаточной мРНК tau по отношению к контрольным клеткам, обработанным PBS. В табл. 15 представлены активности отобранных 5-10-5-гапмеров в клетках Cos1.

Таблица 15

Ингибирование мРНК Tau зеленою мартышки под действием 5-10-5-MOE-гапмеров в клетках Cos1

| SEQ ID NO | Последовательность ASO ¹⁸ | % Остаточной мРНК tau ¹⁹ |
|-----------|---|-------------------------------------|
| 285 | $G^G^T*T^T^G^A^mCATmCGTmCTGmC^mC^T^G^T^*$ | 39 |
| 284 | $mC^mC^G^T*A^mCGTmC^mC^mCAG^mCGT^G^A^T^mC^*$ | 61 |
| 473 | $mC^mC^mC^G^T*A^mCGTmC^mC^mCAG^mCG^T^G^A^T^*$ | 62 |
| 474 | $G^G^mC^mC^A^G^mCGTmC^mCGTmC^A^mC^mC^mC^*$ | 64 |
| 386 | $G^T*mC^mC^mC^A^mC^T*mCTTGTGmC^T^G^G^A^*$ | 53 |
| 335 | $G^A^mC^A^T*mCGTmCTGmC^mCTGT^G^G*mC^T^*$ | 39 |
| 384 | $mC^mC^mC^A^mC^T*mCTTGTGmC^mCTG^G^A^mC^T^*$ | 51 |
| 313 | $mC^mC^T*T^G*mCTmCAGGTmCAA^mC^T^G^G*T^*$ | 37 |
| 366 | $G^T*mC^mC^mC^A^mC^G^G*mCTG^G^A^T^G^G^*$ | 35 |
| 329 | $G^T*mC^T*mC^mC^CTGTGGmCTmC^A^mC^G^A^*$ | 34 |
| 405 | $A^G^T*mC^A^mC^T*mCTmCTGGTGAAT*mC^mC^A^A^*$ | 37 |

18. Нуклеотиды с * имеют модификацию 2'-О-MOE; нуклеотиды без * представляют собой 2'-дезоксинуклеозиды, а mC означает 5-метилцитозин. Межнуклеозидными связями являются фосфортиоатные связи.

19. % Остаточной мРНК означает уровень мРНК tau в клетках Cos1, обработанных одной дозой 2000 нМ ASO tau в течение 24 ч, по сравнению с уровнем мРНК tau в контрольных клетках, обработанных PBS.

Некоторые антисмысловые олигонуклеотиды, которые значительно снижают уровень экспрессии

мРНК tau, были отобраны и протестиированы в нейронах, происходящих от человеческих эмбриональных стволовых клеток (hESC). Результаты представлены как процент остаточной мРНК tau по отношению к контрольным клеткам, обработанным PBS. В табл. 16 представлены активности отобранных антисмысловых олигонуклеотидов в человеческих нейронах.

Таблица 16

Ингибирование экспрессии человеческого tau в нейронах, происходящих от hESC, под действием отобранного ASO Tau

| SEQ ID NO | Последовательность ASO ²⁰ | % Остаточной мРНК ²¹ |
|-----------|--|---------------------------------|
| 285 | G*G*T*T*G*A ^m CAT ^m CGT ^m CTG ^m C*T*G*T* | 9,8 |
| 475 | ^m C* ^m C*A*T*G* ^m C*G*A*G* ^m C*T*G*A*T*A* ^m A* | 20,9 |
| 476 | G* ^m C*A*T* ^m C*G*T* ^m C*A*G* ^m C*T*T*A* ^m C* ^m C*T* | 40,0 |
| 477 | ^m C*T*T*T*G* ^m C*T*T*T*A* ^m C*T*G*A* ^m C* ^m C* | 16,2 |
| 478 | T* ^m C*A* ^m C*T*G*G*T*T*T*G*T*A*G*A* ^m C* | 34,9 |

20. Нуклеотиды с * имеют модификацию 2'-О-MOE; нуклеотиды без * представляют собой 2'-дезоксинуклеозиды, а ^mC означает 5-метилцитозин. Межнуклеозидными связями являются фосфортиоатные связи.

21. % Остаточной мРНК означает уровень мРНК tau в нейронах, происходящих от hESC и обработанных одной дозой 10 мкМ ASO tau в течение 10-14 дней, по сравнению с уровнем мРНК tau в контрольных клетках, обработанных PBS.

Пример 12. Тестирование *in vivo* гапмеров, нацеленных на MAPT.

In vivo активность отобранных 5-10-5-гапмеров тестировали методами, описанными в примере 9. Как показано в табл. 17, некоторые антисмыловые олигонуклеотиды в значительной степени ингибировали экспрессию мРНК и белка человека tau в коре головного мозга и в гиппокампе.

Таблица 17

Ингибирование экспрессии мРНК и белка tau под действием 5-10-5-MOE-гапмеров *in vivo*

| SEQ ID NO | Доза (мкг) | Длительность обработки (недели) | % Остаточной мРНК tau после ASO-обработки ²² | | % Остаточного белка tau после ASO-обработки ²³ | |
|-----------|------------|---------------------------------|---|-----------|---|-----------|
| | | | Кора головного мозга | Гиппокамп | Кора головного мозга | Гиппокамп |
| | | | | | | |
| 284 | 200 | 4 | 56 | 61 | 98 | 82 |
| 473 | 200 | 4 | 76 | 44 | 73 | 69 |
| 474 | 200 | 4 | 48 | 26 | 73 | 66 |
| 386 | 200 | 4 | 50 | 48 | 69 | 68 |
| 335 | 50 | 4 | N/T ²⁴ | 76 | N/T | 103 |
| 384 | 50 | 4 | N/T | 65 | N/T | 111 |
| 313 | 50 | 4 | N/T | 98 | N/T | 144 |

22. % Остаточной мРНК tau означает уровень мРНК tau в указанной ткани головного мозга hTau-трансгенных мышей BAC через четыре недели после одной ICV-инъекции указанного ASO по сравнению с уровнем мРНК tau в соответствующей ткани головного мозга контрольных hTau-трансгенных мышей BAC, которые не были обработаны ASO.

23. % Остаточного белка tau означает уровень белка tau в указанной ткани головного мозга hTau-трансгенных мышей BAC через четыре недели после одной ICV-инъекции указанного ASO по сравнению с уровнем белка tau в соответствующей ткани головного мозга контрольных hTau-трансгенных мышей BAC, которые не были обработаны ASO.

24. N/T=не тестировали.

Все используемые здесь технические и научные термины, если это не оговорено особо, имеют свое общепринятое значение, известное специалистам в области, к которой относится изобретение.

Если это не оговорено особо, то все методы, стадии, технологии и манипуляции, которые конкретно не описаны в настоящем изобретении, могут быть осуществлены способом, известным *per se*. В настоящей заявке приводятся ссылки на стандартные руководства и общий предшествующий уровень техники и цитируемые там документы. Если это не оговорено особо, то каждый из цитируемых здесь документов во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Притязания на изобретение не являются ограничивающими и приводятся ниже.

Хотя в настоящей заявке подробно описаны конкретные аспекты и притязания, однако они рассматриваются лишь в целях иллюстрации и не ограничивают объем, сформулированный в формуле изобретения, или объем предмета притязаний любой соответствующей заявки, которая будет подана в бу-

дущем. В частности, авторами настоящего изобретения предполагается, что в настоящую заявку могут быть внесены различные замены, изменения и модификации, не выходящие за рамки существа и объема изобретения, определенного в формуле изобретения. Выбор исходного нуклеиновокислотного материала, представляющего интерес клона или типа библиотеки, может быть осуществлен самим специалистом в данной области исходя из информации об описанных здесь аспектах. Считается, что другие аспекты, преимущества и модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения. Специалистам в данной области будет понятно или установлено с использованием не более чем рутинных экспериментов, что в настоящее изобретение могут быть включены многие эквиваленты конкретных аспектов настоящего изобретения. Такие эквиваленты входят в объем прилагаемой формулы изобретения. Пересмотр объема притязаний позже поданных соответствующих заявок может быть обусловлен ограничениями в патентных законодательствах различных стран и не должен быть истолкован как отказ от предмета изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Олигонуклеотид для лечения tau-ассоциированного заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом, содержащий последовательность нуклеотидных оснований, которая по меньшей мере на 90% идентична любой из

CCGTACGTCC CAGCGTGATC (SEQ ID NO: 205 или SEQ ID NO: 284) ;
 GGTTGACATC GTCTGCCTGT (SEQ ID NO: 208 или SEQ ID NO: 285) ;
 GGGCTCAGCC ATCCTGGTTC (SEQ ID NO: 286) ;
 GGCTCTCCA GCGGCAAGGA (SEQ ID NO: 287) ;
 CCCTCTGGT CTTGGTGCAT (SEQ ID NO: 288) ;
 GCTGGTCTCT GTTGGGTCCC (SEQ ID NO: 289) ;
 GTCCCACTCT TGTGCCTGGA (SEQ ID NO: 290) ; или
 GGGCTCTCTC CATGTCAACA (SEQ ID NO: 291) ;

где С в любой из последовательностей нуклеотидных оснований представляет собой либо цитозин, либо 5-метилцитозин, и где по меньшей мере один нуклеотид этого олигонуклеотида имеет 2'-модификацию.

2. Олигонуклеотид по п.1, где указанный олигонуклеотид содержит последовательность нуклеотидных оснований, которая по меньшей мере на 95% идентична любой из

CCGTACGTCC CAGCGTGATC (SEQ ID NO: 205 или SEQ ID NO: 284) ;
 GGTTGACATC GTCTGCCTGT (SEQ ID NO: 208 или SEQ ID NO: 285) ;
 GGGCTCAGCC ATCCTGGTTC (SEQ ID NO: 286) ;
 GGCTCTCCA GCGGCAAGGA (SEQ ID NO: 287) ;
 CCCTCTGGT CTTGGTGCAT (SEQ ID NO: 288) ;
 GCTGGTCTCT GTTGGGTCCC (SEQ ID NO: 289) ;
 GTCCCACTCT TGTGCCTGGA (SEQ ID NO: 290) ; или
 GGGCTCTCTC CATGTCAACA (SEQ ID NO: 291) .

3. Олигонуклеотид по п.2, где указанный олигонуклеотид содержит последовательность нуклеотидных оснований, выбранную из группы, состоящей из

CCGTACGTCC CAGCGTGATC (SEQ ID NO: 205 или SEQ ID NO: 284) ;
 GGTTGACATC GTCTGCCTGT (SEQ ID NO: 208 или SEQ ID NO: 285) ;
 GGGCTCAGCC ATCCTGGTTC (SEQ ID NO: 286) ;
 GGCTCTCCA GCGGCAAGGA (SEQ ID NO: 287) ;
 CCCTCTGGT CTTGGTGCAT (SEQ ID NO: 288) ;
 GCTGGTCTCT GTTGGGTCCC (SEQ ID NO: 289) ;
 GTCCCACTCT TGTGCCTGGA (SEQ ID NO: 290) ; или
 GGGCTCTCTC CATGTCAACA (SEQ ID NO: 291) .

4. Олигонуклеотид по любому из пп.1-3, где межнуклеозидной связью олигонуклеотида является фосфодиэфирная или фосфортиоатная связь.

5. Олигонуклеотид по п.4, где межнуклеозидной связью олигонуклеотида является фосфортиоатная связь.

6. Олигонуклеотид по любому из пп.4, 5, где олигонуклеотид содержит по меньшей мере пять смежных 2'-дезоксинуклеозидов, предпочтительно по меньшей мере семь смежных 2'-дезоксинуклеозидов, более предпочтительно по меньшей мере десять смежных 2'-дезоксинуклеозидов.

7. Олигонуклеотид по любому из пп.5, 6, где указанный олигонуклеотид снижает уровень экспрессии мРНК или белка tau под действием активирующей РНКазы Н.

8. Олигонуклеотид по любому из пп.1-7, где каждый С в любых последовательностях нуклеотидных оснований представляет собой 5-метилцитозин.

9. Олигонуклеотид по любому из пп.1-8, где 2'-модификация выбрана из группы, состоящей из 2'-фтора, 2'-дезокси-2'-фтора, 2'-О-метила, 2'-О-метоксиэтила (2'-О-MO), 2'-О-аминопропила (2'-О-AP), 2'-О-диметиламиноэтила (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропила (2'-О-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-О-DMAEOE) и 2'-О-N-метилацетамида (2'-О-NMA).

10. Олигонуклеотид по любому из пп.1-9, где 2'-модификацией является 2'-О-метоксиэтил (2'-О-MOE).

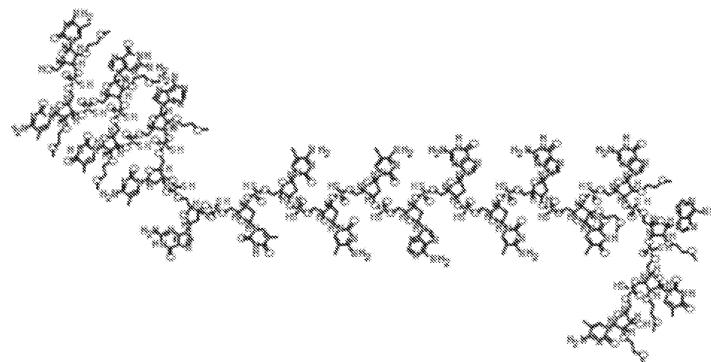
11. Олигонуклеотид по любому из пп.1-10, где олигонуклеотид обладает способностью снижать уровень экспрессии мРНК или белка tau по меньшей мере на 30% *in vitro* или по меньшей мере на 30% *in vivo*.

12. Композиция для лечения tau-ассоциированного заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом, содержащая олигонуклеотид по любому из пп.1-11 и фармацевтически приемлемый носитель.

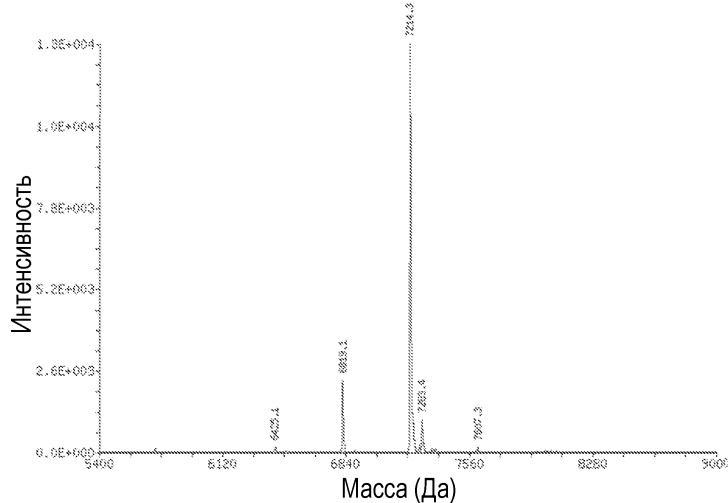
13. Применение олигонуклеотида по любому из пп.1-11 для лечения tau-ассоциированного заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом.

14. Применение по п.13, где tau-ассоциированное заболевание выбрано из болезни Альцгеймера (БА), амиотрофического бокового склероза/комплекса паркинсонизм-деменция (АБС-КПД), деменции в области аргирофильных зерен (ДАГЗ), амилоидной ангиопатии британского типа, церебральной амилоидной ангиопатии, хронической травматической энцефалопатии (ХТЭ), кортикобазальной дегенерации (КБД), болезни Крейцфельда-Якоба (БКЯ), деменции боксеров, диффузных повреждений нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, синдрома Дауна, синдрома Дравета, эпилепсии, деменции в области лобно-височной доли (ДЛВД), деменции в области лобно-височной доли, ассоциированной с паркинсонизмом, сцепленным с хромосомой 17 (FTDP-17), дегенерации передней лобно-височной доли, ганглиоглиомы, ганглиоцитомы, болезни Герстманна-Штраусслера-Шейнкера, болезни Галервортена-Шпатца, болезни Гентингтона, миозита, вызываемого тельцами включения, энцефалопатии, вызываемой свинцом, болезни Литико-Бодига, менингиоангиоматоза, атрофии многих органов, миотонической дистрофии, болезни Нимана-Пика типа С (НП-С), негваманиеевомого заболевания двигательных нейронов, ассоциированного с поражением нейрофибриллярных клубков, болезни Пика (БП), постэнцефалитного паркинсонизма, церебральной амилоидной ангиопатии, вызываемой белками прионами, прогрессирующего субкортикального глиоза, прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП), подострого склерозирующего панэнцефалита, деменции, поражающей только область клубков, деменции, преобладающей в области клубков, мультиинфарктной деменции, ишемического инсульта или клубневого склероза.

15. Олигонуклеотид для лечения tau-ассоциированного заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом, содержащий последовательность нуклеотидных оснований, выбранную из любых SEQ ID NO: 205, 208, 284 и 285.



Фиг. 1А

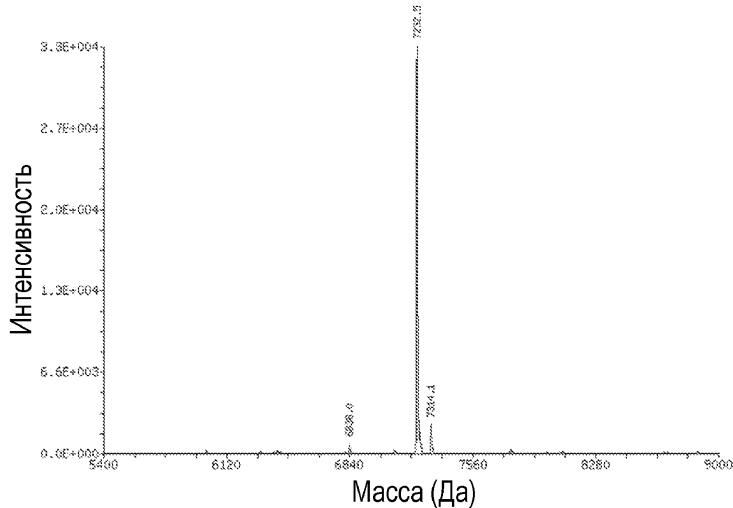


Фиг. 1В

Список пиков массы, отсортированных по интенсивности:

| Масса (Да) | Ср. кв. откл. | Интенсивность | Оценка | Δ массы | % Относительных величин | Общий % | Предположительная идентичность |
|------------|---------------|---------------|--------|----------------|-------------------------|---------|--------------------------------|
| 7214.4 | 0.2 | 1.00E+004 | 15.48 | 0.0 | 100.00 | 68.18 | |
| 6839.4 | 0.5 | 2.28E+003 | 8.86 | -355.2 | 20.84 | 12.02 | |
| 7224.4 | 0.3 | 1.22E+003 | 8.71 | 15.4 | 6.42 | 5.43 | |
| 7234.4 | 0.6 | 1.04E+003 | 8.18 | 69.1 | 7.38 | 5.86 | |
| 6826.4 | 0.7 | 9.82E+002 | 8.83 | +387.8 | 7.57 | 5.18 | |
| 7244.4 | 0.3 | 9.29E+002 | 8.20 | 82.7 | 5.72 | 2.17 | |
| 7207.4 | 0.6 | 1.58E+002 | 8.21 | 338.0 | 1.20 | 2.82 | |
| 6828.4 | 0.8 | 1.86E+002 | 8.21 | +739.2 | 1.10 | 2.83 | |

Фиг. 1С



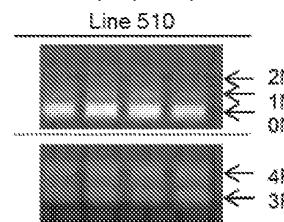
Фиг. 1Д

Список пиков массы, отсортированных по интенсивности:

| Масса (Да) | Ср. кв. откл. | Интенсивность | Оценка | Δ массы | % Относительных величин | Общий % | Предположительная идентичность |
|------------|---------------|---------------|--------|----------------|-------------------------|---------|--------------------------------|
| 7232.2 | 0.2 | 3.02E+003 | 13.02 | 0.0 | 100.00 | 85.38 | |
| 7248.4 | 0.7 | 2.38E+003 | 8.18 | 16.0 | 7.08 | 6.08 | |
| 7314.1 | 0.2 | 2.00E+003 | 7.16 | 81.8 | 6.94 | 5.97 | |
| 6838.0 | 0.4 | 7.55E+002 | 8.18 | +384.8 | 2.26 | 2.26 | |

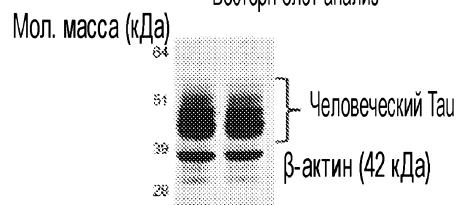
Фиг. 1Е

Изоформы в переднем головном мозге
ОТ-ПЦР-транскрипты



Фиг. 2А

Изоформы в переднем головном мозге
Вестерн-блот-анализ



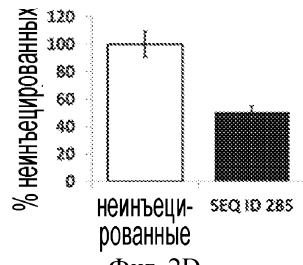
Фиг. 2В

Иммуногистохимический анализ на распределение человеческого Tau



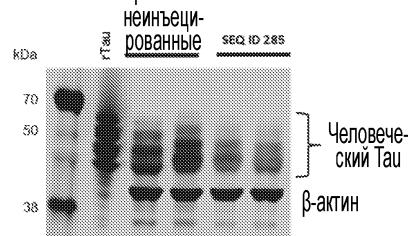
Фиг. 2С

Ингибирование мРНК Tau через 4 недели после ASO-обработки коры головного мозга



Фиг. 2Д

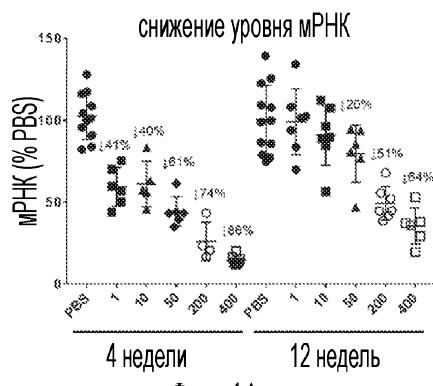
Ингибирование белка Tau через 4 недели после ASO-обработки гиппокампа



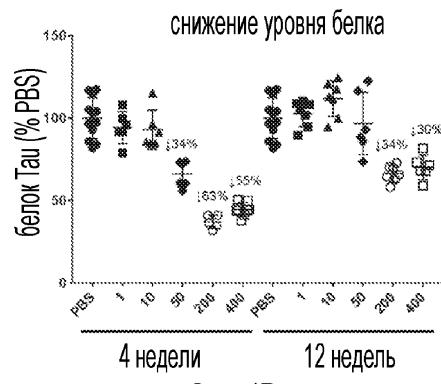
Фиг. 2Е



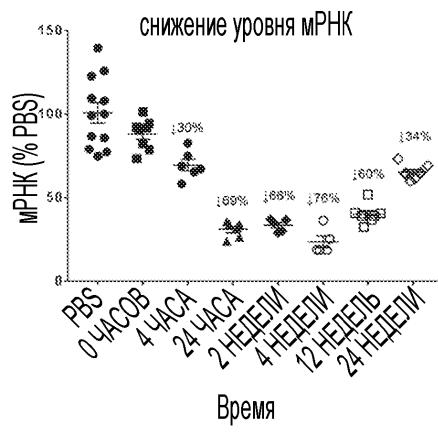
Фиг. 3



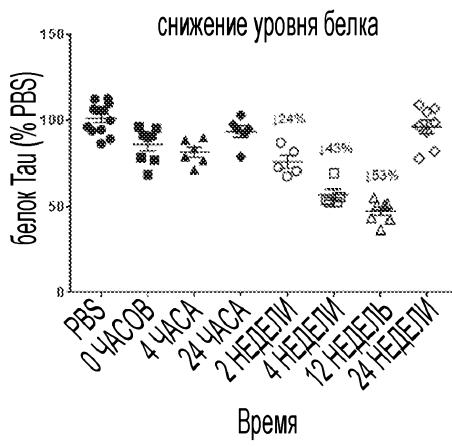
Фиг. 4А



Фиг. 4В



Фиг. 5А



Фиг. 5В

