

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 984 631**

⑮ Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61K 31/7115 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- ⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2016** PCT/IB2016/057794
⑦ Fecha y número de publicación internacional: **29.06.2017** WO17109679
⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2016** E 16823350 (0)
⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2024** EP 3394259

⑮ Título: **Composiciones y procedimientos para disminuir la expresión de tau**

⑩ Prioridad:

21.12.2015 US 201562270165 P

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.10.2024

⑮ Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

⑮ Inventor/es:

POLYDORO OFENGEIM, MANUELA y WEILER, JAN

⑮ Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 984 631 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para disminuir la expresión de tau

5 Campo de la invención

CAMPO TÉCNICO

10 La presente invención proporciona oligonucleótidos antisentido, composiciones y usos de los mismos para disminuir la expresión de ARNm de tau y proteína tau tal como se define en las reivindicaciones. Estos oligonucleótidos antisentido, composiciones y usos de los mismos son útiles para tratar enfermedades asociadas a tau.

ANTECEDENTES

15 Tau es una proteína asociada a microtúbulos que estabiliza los microtúbulos y facilita el transporte axonal. La proteína tau interactúa con la tubulina para estabilizar los microtúbulos y promover el ensamblaje de la tubulina en microtúbulos. La red de microtúbulos está implicada en muchos procesos celulares importantes, que incluyen la formación del citoesqueleto y el mantenimiento de la estructura y la morfología de la célula, y la provisión de plataformas para el transporte intracelular de vesículas, orgánulos y macromoléculas. Puesto que la unión de tau a microtúbulos estabiliza los microtúbulos, tau es un mediador clave de estos procesos celulares.

20 Existen al menos seis isoformas de tau en el cerebro humano, que varían de 352 a 441 residuos de aminoácidos de longitud. Las isoformas de tau se derivan de un único gen MAPT (proteína tau asociada a microtúbulos) ubicado en el cromosoma 17. El transcripto de MAPT experimenta un corte y empalme alternativo regulado, complejo, que da lugar a múltiples especies de ARNm. Los exones 2 y 3 de MAPT codifican una secuencia de 29 o 58 aminoácidos respectivamente, y por lo tanto el corte y empalme alternativo de los exones 2 y/o 3 da lugar a la inclusión de cero, una o dos copias del dominio ácido de 29 aminoácidos N-terminal, que se denominan tau 0N, 1N o 2N, respectivamente. El exón 10 de MAPT codifica un dominio de unión a microtúbulos, por lo que la inclusión del exón 10 da lugar a la presencia de un dominio de unión a microtúbulos adicional. Dado que hay tres dominios de unión a microtúbulos en otra parte de tau, las isoformas de tau que incluyen el exón 10 se denominan "4R tau", lo que significa la proteína tau con cuatro repeticiones del dominio de unión a microtúbulos. Las isoformas de tau sin exón 10 se denominan "tau 3R", lo que significa la proteína tau con tres repeticiones del dominio de unión a microtúbulos. Las isoformas de 4R tau presumiblemente se unen a microtúbulos mejor que las isoformas de 3R tau, ya que tienen un dominio de unión a microtúbulos más. La relación de 3R tau a 4R tau está regulada por el desarrollo, con tejidos fetales que expresan exclusivamente 3R tau y tejidos humanos adultos que expresan niveles aproximadamente iguales de 3R tau y 4R tau.

25 Tau es una fosfoproteína con aproximadamente 85 sitios de fosforilación potenciales (Ser, Thr o Tyr) en la isoforma de tau más larga (Pedersen y Sigurdsson, Trends in Molecular Medicine 2015, 21 (6): 394). Se ha informado de fosforilación en aproximadamente la mitad de estos sitios en las proteínas tau normales. Tau se fosforila y desfosforila dinámicamente durante el ciclo celular. Tau solo puede asociarse con microtúbulos en su forma desfosforilada, y, por lo tanto, la fosforilación de tau actúa como un conmutador directo de asociación-disociación de microtúbulos dentro de la neurona. En condiciones patológicas, la proteína tau se hiperfosforila, dando como resultado una pérdida de unión a tubulina y la desestabilización de microtúbulos, seguida de la agregación y la deposición de tau en ovillos neurofibrilares patógenos. 30 También se han identificado fragmentos de escisión de proteasa de tau (Asp 13, Glu391 y Asp421) en ovillos neurofibrilares. Un ejemplo de los enfoques considerados actualmente para abordar la agregación de tau se divulga en el documento WO 2015/010135 (ISIS Pharmaceuticals Inc.) mediante el uso del gápmero MOE 5-10-5 con enlaces fosforotioato y 5-metilcitosina.

Sumario de la invención

35 La invención se define como en las reivindicaciones adjuntas. En el presente documento se proporcionan oligonucleótidos antisentido que tienen las SEQ ID NO: 208 o 285 y que están dirigidos a la proteína tau asociada a microtúbulos (MAPT) humana, composiciones que comprenden los oligonucleótidos antisentido, y usos de los mismos para disminuir la expresión de ARNm de tau y proteína tau usando estos oligonucleótidos antisentido, tal como se definen en las reivindicaciones. Estos oligonucleótidos antisentido, composiciones y usos proporcionados en el presente documento son útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas a tau.

40 Los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT proporcionados en el presente documento son gápmberos, que tienen un segmento de hueco (gap) central de 2'-desoxirribonucleótidos contiguos, ubicados entre dos segmentos de ala en los extremos 5' y 3' (también denominados ala 5' y ala 3', respectivamente). Tales oligonucleótidos antisentido disminuyen la expresión de ARNm de tau y/o proteína tau mediante la activación de ARNasa H. Los enlaces internucleosídicos de gápmberos son enlaces fosforotioato. Los gápmberos comprenden un tramo a menudo de (10) 2'-desoxirribonucleótidos contiguos y los segmentos de ala 5' y 3' comprenden uno o más nucleótidos modificados en 2'. La modificación en 2' es 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE).

En las presentes formas de realización tal como se reivindican, los gápmberos dirigidos a tau son gápmberos 5-10-5 que tienen 20 nucleósidos de longitud, en los que el segmento de hueco central comprende diez 2'-desoxinucleósidos contiguos, flanqueados por el ala 5' y el ala 3', comprendiendo cada ala cinco nucleósidos cada uno con una modificación 2'-O-MOE.

5

En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT proporcionados en el presente documento son capaces de disminuir el nivel de expresión de ARNm de tau o proteína tau en al menos el 30% *in vitro*.

10

En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT proporcionados en el presente documento son capaces de disminuir el nivel de expresión de ARNm de tau o proteína tau en al menos el 30% *in vivo*.

En otro aspecto, se proporcionan en el presente documento composiciones que comprenden cualquiera de los oligonucleótidos antisentido descritos en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15

En un aspecto adicional, se proporcionan en el presente documento procedimientos para disminuir el nivel de expresión de tau en un sujeto, por ejemplo, un sujeto afectado por, o susceptible a, una enfermedad asociada a tau, mediante administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los oligonucleótidos antisentido descritos en el presente documento. Dichos procedimientos pueden incluir administrar un segundo agente al sujeto. En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido dirigido a MAPT puede administrarse al sujeto a través de una vía intratecal, intracranial, intranasal, oral, intravenosa o subcutánea. En algunos aspectos, el sujeto es un ser humano.

20

También se proporcionan oligonucleótidos o composiciones antisentido tal como se describen en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a tau en un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un sujeto afectado por, o susceptible a, una enfermedad asociada a tau.

La enfermedad asociada a tau se selecciona del grupo de enfermedad de Alzheimer (EA), esclerosis lateral amiotrófica/complejo de parkinsonismo-demencia (ALS-PDC), demencia argirofílica granulosa (AGD), angiopatía amiloide de tipo británico, angiopatía amiloide cerebral, encefalopatía traumática crónica (CTE), degeneración corticobasal (CBD), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), demencia pugilística, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, síndrome de Down, síndrome de Dravet, epilepsia, demencia frontotemporal (FTD), demencia frontotemporal con parkinsonismo asociado al cromosoma 17 (FTDP-17), degeneración lobular frontotemporal, ganglioglioma, gangliocitoma, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, enfermedad de Halervorden-Spatz, enfermedad de Huntington, miositis de cuerpos de inclusión, encefalopatía plúmbica, enfermedad de Lytico-Bodig, meningioangiomatosis, atrofia multisistémica, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NP-C), enfermedad de neuronas motoras no de Guam con ovillos neurofibrilares, enfermedad de Pick (PiD), parkinsonismo postencefálico, angiopatía amiloide cerebral por proteína priónica, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva (PSP), panencefalitis esclerosante subaguda, demencia solo con ovillos, demencia predominante de ovillos, demencia multiinfarto, accidente cerebrovascular isquémico o esclerosis tuberosa.

40

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1E muestran la caracterización física de oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT. La figura 1A muestra la estructura del oligonucleótido antisentido (ASO) que comprende la SEQ ID NO: 284, con la fórmula C230H321N72O120P19S19 y el peso molecular esperado de 7212,3 Da. La figura 1B muestra los datos de cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM) de ASO que comprende la SEQ ID NO: 284, con una masa de pico medida de 7214,3. La figura 1C muestra el informe de pico de deconvolución de CL-EM para ASO que comprende la SEQ ID NO: 284. La figura 1D muestra los datos de CL-EM de ASO que comprende la SEQ ID NO: 285, con una masa de pico medida de 7232,5. La figura 1E muestra el informe de pico de deconvolución de CL-EM para ASO que comprende la SEQ ID NO: 285.

45

Las figuras 2A-2E muestran el nivel de expresión de ARNm de tau humana y proteína tau humana en una línea de ratón transgénico BAC hTau representativa antes y después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido. La figura 2A es representativa de los resultados de RT-PCR que muestran que los seis transcritos de tau humana se encontraron en el prosencéfalo de los ratones transgénicos BAC hTau (línea transgénica 510, ratones hembra de dos meses de edad). Los exones 2, 3 y 10 se empalmaron alternativamente, dando como resultado seis isoformas de tau: 2-3-10-; 2+3-10-; 2+3+10-; 2-3-10+; 2+3-10+; 2+3+10+. 4R representa isoformas de tau con el exón 10, 3R representa isoformas de tau sin el exón 10; 0N representa isoformas de tau sin el exón 2 ni el exón 3; 1N representa isoformas de tau con el exón 2 o el exón 3; 2N representa isoformas de tau tanto con el exón 2 como con el exón 3. La figura 2B es una inmunotransferencia Western representativa que muestra seis isoformas de la proteína tau que varían de 352 a 441 aminoácidos con pesos moleculares de 48 a 67 kD. Difieren en (1) la inclusión de cero, uno o dos insertos de una parte N-terminal de 29 aminoácidos (0N, 1N o 2N), o (2) la inclusión de tres o cuatro dominios de unión a microtúbulos (3R o 4R). La figura 2C es una imagen inmunohistoquímica representativa que muestra la distribución axonal normal de tau humana en el cerebro de ratones transgénicos BAC hTau, teñida con un anticuerpo específico de tau humana. La figura 2D es un gráfico de barras que muestra

el silenciamiento (*knockdown*) del ARNm de tau en la corteza de ratón transgénico BAC hTau 4 semanas después de un único tratamiento con un oligonucleótido antisentido que comprende la SEQ ID NO: 285. La figura 2E es una inmunotransferencia Western representativa que muestra el silenciamiento de la proteína tau en el hipocampo de ratón transgénico BAC hTau 4 semanas después de un único tratamiento con un oligonucleótido antisentido que comprende la SEQ ID NO: 285.

La figura 3 es un conjunto de imágenes de hibridación *in situ* que muestran una amplia distribución en el cerebro del oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO: 285 en ratones transgénicos BAC hTau.

Las figuras 4A y 4B son gráficos de puntos que muestran la inhibición dependiente de la dosis de la expresión de ARNm de tau humana (figura 4A) y proteína tau humana (figura 4B) en ratones transgénicos BAC hTau 4 semanas o 12 semanas después de una única inyección ICV de 1, 10, 50, 200 o 400 ug del oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO: 285.

Las figuras 5A y 5B son gráficos de puntos que muestran el curso temporal del nivel de expresión de ARNm de tau humana (figura 5A) y proteína tau humana (figura 5B) en ratones transgénicos BAC hTau después de una única inyección ICV de 200 ug del oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO: 285.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En el presente documento se proporcionan oligonucleótidos antisentido dirigidos a proteína tau asociada a microtúbulos (MAPT), composiciones que comprenden los oligonucleótidos antisentido según las reivindicaciones, y usos de los mismos para tratar enfermedades asociadas a tau según las reivindicaciones.

Definiciones

Tal como se utiliza en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la forma en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, incluidas mezclas de las mismas.

Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, incluidos intervalos, son aproximaciones que varían (+) o (-) en incrementos de 0,1. Se ha de entender, aunque no siempre se indique explícitamente, que todas las designaciones numéricas van precedidas por el término "aproximadamente". También se ha de entender, aunque no siempre se indique explícitamente, que los reactivos descritos en el presente documento son meramente ejemplos y que se conocen equivalentes de los mismos en la técnica.

El término "modificación en 2'" se refiere a la sustitución de H u OH en la posición 2' del anillo de furanosa de un nucleósido o nucleótido por otro grupo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "2'-O-metoxietilo", "2'-MOE" o "2'-OCH₂CH₂-OCH₃" se refiere a una modificación O-metoxietilo de la posición 2' de un anillo de furanosa. Un azúcar con una modificación de tipo 2'-O-metoxietilo es un azúcar modificado. Un "nucleósido/nucleótido 2'-MOE" o "nucleósido/nucleótido 2'-O-metoxietilo" se refiere a un nucleósido/nucleótido que comprende un resto de azúcar modificado con 2'-MOE.

Una "5-metilcitosina" se refiere a una citosina modificada con un grupo metilo unido a la posición 5'.

El término "oligonucleótido antisentido", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido monocatenario que tiene una secuencia de nucleobases que es complementaria a un segmento correspondiente de un ácido nucleico diana, por ejemplo, una secuencia genómica diana, pre-ARNm o molécula de ARNm. En algunas formas de realización, un oligonucleótido antisentido tiene de 12 a 30 nucleobases de longitud.

El término "complementariedad" o "complementario" se refiere a la capacidad de emparejamiento de bases entre las nucleobases de una primera cadena de ácido nucleico y las nucleobases de una segunda cadena de ácido nucleico, mediada por enlace de hidrógeno (por ejemplo, enlace de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso) entre nucleobases correspondientes. Por ejemplo, en el ADN, la adenina (A) es complementaria a la timina (T); y la guanosina (G) es complementaria a la citosina (C). Por ejemplo, en el ARN, la adenina (A) es complementaria al uracilo (U); y la guanosina (G) es complementaria a la citosina (C). En determinadas formas de realización, nucleobase complementaria significa una nucleobase de un oligonucleótido antisentido que es capaz de emparejarse con una nucleobase de su ácido nucleico diana. Por ejemplo, si una nucleobase en una determinada posición de un oligonucleótido antisentido es capaz de formar enlaces de hidrógeno con una nucleobase en una determinada posición de un ácido nucleico diana, entonces la posición de enlace de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana se considera complementaria en ese par de nucleobases. Las nucleobases que comprenden determinadas modificaciones pueden conservar la capacidad de emparejarse con una nucleobase contraparte y, por lo tanto, todavía son capaces de complementariedad de nucleobases.

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados. Por ejemplo, una cantidad terapéutica es aquella que logra el efecto terapéutico deseado. Esta cantidad puede ser igual o diferente de una cantidad profilácticamente eficaz, que es una cantidad necesaria para prevenir la aparición de una enfermedad o síntomas de una enfermedad. Puede administrarse una cantidad eficaz en una o más administraciones, aplicaciones o 5 dosis. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto terapéutico (es decir, una dosis eficaz) depende de los compuestos terapéuticos seleccionados. Las composiciones pueden administrarse de una o más veces al día a una o más veces a la semana; incluyendo una vez cada dos días. El experto en la técnica apreciará que determinados factores 10 pueden influir en la dosificación y el tiempo necesarios para tratar eficazmente a un sujeto, incluidos, pero sin limitación, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos terapéuticos descritos en el presente documento puede incluir un único tratamiento o una serie de 15 tratamientos.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "gápmero" se refiere a un oligonucleótido antisentido químérico 15 que comprende un segmento de hueco (gap) central que consiste en 2'-desoxirribonucleótidos contiguos, que es capaz de activar la ARNasa H, flanqueado por dos segmentos de ala en los extremos 5' y 3', que comprenden cada uno uno o más nucleótidos modificados, que confieren mayor resistencia a la degradación por nucleasas.

El término "hibridación" se refiere al emparejamiento de bases de cadenas de ácido nucleico complementarias y la 20 formación de una estructura dúplex. La hibridación puede producirse entre cadenas de ácido nucleico totalmente complementarias o entre cadenas de ácido nucleico "sustancialmente complementarias" que contienen regiones secundarias de emparejamiento erróneo. Aunque no se limita a un mecanismo particular, el mecanismo más común de emparejamiento implica enlaces de hidrógeno, que pueden ser enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o 25 Hoogsteen inverso, entre nucleobases complementarias de las cadenas de ácido nucleico. Por ejemplo, adenina y timina son nucleobases complementarias que se emparejan por medio de la formación de enlaces de hidrógeno. La hibridación puede producirse en circunstancias de rigurosidad variables. Tal como se utiliza en el presente documento, hibridación se refiere al emparejamiento de bases de cadenas de ácido nucleico complementarias y la formación de una estructura 30 dúplex al menos en una condición de rigurosidad relativamente baja, por ejemplo, puede usarse la hibridación en 2X SSC (cloruro de sodio 0,3 M, citrato de sodio 0,03 M), SDS al 0,1% a 37°C, seguida de lavado en solución que contiene 4 X SSC, SDS al 0,1% a 37°C, con un lavado final en 1 X SSC a 45°C.

El término "inhibir" o "inhibición" se refiere a una reducción o bloqueo de la expresión o la actividad de un ácido nucleico o proteína diana y no indica necesariamente una eliminación total de la expresión o la actividad de la diana.

35 El término "enlace internucleosídico" se refiere al enlace químico entre nucleósidos.

El término "silenciamiento" o "silenciamiento de la expresión" se refiere a la expresión reducida de ARNm o proteína de 40 un gen después del tratamiento con un reactivo, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido. El silenciamiento de la expresión puede producirse durante la transcripción, el corte y empalme del ARNm o la traducción.

45 El término "emparejamiento erróneo" se refiere al caso en el que una nucleobase de una primera cadena de ácido nucleico no es complementaria a la nucleobase correspondiente de una segunda cadena de ácido nucleico.

El término "secuencia de nucleobases" se refiere al orden de nucleobases contiguas independientemente de cualquier 45 azúcar, enlace y/o modificación de nucleobases.

El término "oligonucleótido" se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos (ADN) y/o ribonucleótidos (ARN) unidos, 50 cada uno de los cuales está modificado o no modificado. A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico natural, y ácidos nucleicos que tienen enlaces internucleosídicos alternativos distintos de los enlaces fosfodiéster.

55 El término "enlace fosforotioato" se refiere a un enlace entre nucleósidos en el que el enlace fosfodiéster se modifica reemplazando uno de los átomos de oxígeno que no forma puente por un átomo de azufre.

El término "cadena sentido" se refiere a la cadena codificante, cadena plus o cadena que no es plantilla de la molécula de ADN que 60 consiste en una estructura bicatenaria. La cadena codificante tiene la misma secuencia que la secuencia de ARNm excepto que la timina (T) en el ADN se reemplaza por uracilo (U) en el ARN. Una "cadena antisentido" se refiere a la cadena no codificante o cadena plantilla de la molécula de ADN, que actúa como plantilla para la síntesis de ARNm. Por lo tanto, la secuencia de la cadena antisentido es complementaria a la secuencia de la cadena sentido y el ARNm (U en el ARN en lugar de T).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "bloqueador estérico" se refiere a un oligonucleótido antisentido que se hibrida con un ácido nucleico diana (por ejemplo, una secuencia genómica diana, pre-ARNm o molécula de ARNm)

e interfiere con la transcripción, el corte y empalme y/o la traducción del ácido nucleico diana sin la activación de ARNasa H.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, "que está dirigido" o "dirigido" se refiere al diseño y selección de un oligonucleótido antisentido que puede hibridarse específicamente con un ácido nucleico diana, por ejemplo, una secuencia genómica diana, pre-ARNm o molécula de ARNm, o un fragmento o variante de la misma, y modular la transcripción, el corte y empalme y/o la traducción del ácido nucleico diana.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, "tau" (también conocida como "proteína tau asociada a microtúbulos", MAPT, MSTD; PPND; DDPAC; MAPTL; MTBT1; MTBT2; FTDP-17; PPP1R103) se refiere a una proteína asociada a microtúbulos codificada por el gen MAPT. El gen de MAPT humano se mapea en la ubicación cromosómica 17q21.1, y la secuencia genómica del gen de MAPT humano puede encontrarse en GenBank en NG_007398.1 (SEQ ID NO: 304). Las secuencias de intrones y exones de MAPT y los puntos de ramificación pueden determinarse basándose en el sitio de Internet de la base de datos de genomas de Ensembl usando Transcript: MAPT-203 ENST00000344290. Debido al corte 15 y empalme alternativo complicado, ocho isoformas de tau están presentes en el ser humano. El término "tau" se usa para referirse colectivamente a todas las isoformas de tau. Las secuencias de proteína y ARNm para la isoforma tau humana más larga son:

Proteína tau asociada a microtúbulos (MAPT) de *Homo sapiens*, variante 6 de transcripto, ARNm (NM_001123066.3)

1 ggacggccga gggcaggcgc gtcgcgcgc gcccactgt ggccggagga gaaggtccc
 61 gggaggccg cgctgcgcgc cccctccct ggggaggcgc cggttccgc tgcgcgc
 121 tgcggccccc gcccgcctca ggaacgcgcgc ctcttcggc gcgcgcgc tgcgcgc
 181 cggcaccacac cagtcgcgc accaacagca ggcgcgcgc caccgcac ctttcgc
 241 cggcaccacac gccacccctct ctcttcggc tgccttcgc tgccttcgc
 301 atcaggtaa ctttgcacca ggtggctga gccccggcag gagttcgaag tgatggaga
 361 tcacgctggg acgtacgggt tgggggacag gaaagatcg gggggctaca ccatgcacca
 421 agaccaagag ggtgacacgg acgctggct gaaagaatct cccctgcaga cccccactga
 481 ggacggatct gaggacccgg gctctgaaac ctctgtatct aagagcactc caacagcgg
 541 agatgtgaca gcaccccttag tggatgaggg agtcccgcc aagcaggctg ccgcgcagcc
 601 ccacacggag atcccagaag gaaccacagc tgaagaagca ggcattggag acacccccc
 661 cctggaaagac gaagctgcgt gtcacgtgac ccaagggct gaaagtggta aggtgttca
 721 ggaaggcttc ctccgagagc caggcccccc aggtctgagc caccagctca tgtccggcat
 781 gcctggggct cccctctgc ctgagggccc cagagggcc acacgccaac ctteggggac
 841 aggacctgag gacacagagg gcccgcgc cgcggctgatct ctgctcaagc accagcttct
 901 aggagacctg caccaggagg ggccgcgcgt gaagggggca gggggcaaaag agaggccgg
 961 gagcaaggag gagggtggat aagaccgca cgctgatgg tccctcccc aagactcccc
 1021 tccctccaag gctcccccag cccaagatgg ggggcctccc cagacagecg ccagagaagc
 1081 caccagcatc ccaggcttc cagcgagggg tgccatcccc ctccctgtgg atttctctc
 1141 caaagtttcc acagagatcc cagcctcaga gcccgcacggg cccagttgtgg ggcggccaa
 1201 agggcaggat gccccctgg agttcacgtt tcacgtggaa atcacacca acgtcagaa
 1261 ggagcaggcg cactcgagg aggcatggg aagggtgc tttccagggg cccctggaga
 1321 gggggccagag gcccggggcc cctcttggg agaggacaca aaagaggctg accttccaga
 1381 gcccctctgaa aagcagccctg ctgctctcc gggggggaaag cccgtcagcc gggccctca
 1441 actcaaagct cgcattggca gtaaaagcaa agacgggact ggaagcgtatg aaaaaaaagc
 1501 caagacatec acacgttccct ctgtaaaaat aggcccttgc ttagccccaa
 1561 acacccact cctgttagct cagaccctct gatccaaacc tccagccctg ctgtgtgcc
 1621 agagccaccc tccctctcta aatacgctc ttctgtcact tccgcactg gcagttctgg
 1681 agcaaaggag atgaaaactca agggggctga tggtaaaacg aagatcgcca caccgggg
 1741 agcagccctt ccaggccaga agggccaggg caacgcaccaggattccag caaaaacccc
 1801 gcccgcctca aagacaccac ccagctctgc gactaagca gtccagagaa gaccaccc
 1861 tgcagggccc agatctgaga gaggtaacc tccaaatca ggggatgc gggctacag
 1921 cagccccggc tccccaggca ctcccggcag ccgtccccgc acccctgc tccaaacccc
 1981 acccaccctgg gagcccaaga aggtggcagt ggtccgtact ccaccaagt cgcgtcttc
 2041 cgccaaagagc cgcctcgaga cagccccctg gcccattgca gacctaaga atgtcaagtc
 2101 caagatcgcc tccactgaga acctgaagca ccagccggga ggcgggaaagg tgcagataat
 2161 taataagaag ctggatcta gcaacgtcca gtccaaagtgt ggctcaaagg ataataatcaa
 2221 acacgtcccg ggaggcggca gtgtcaaat agtctacaaa ccagttgacc tgagaaggt
 2281 gacctccaag tggctcat taggaacat ccaatataaa ccaggaggatg gccaggatgg
 2341 agtaaaaatct gagaagctg acttcaagga cagagtccag tcgaagattg ggtccctgg
 2401 caataatcacc cacgtccctg gcccggggaaa taaaagatt gaaacccaca agtgcaccc
 2461 cccgcggaaac gccaaagcaca agacagacca cggggcggag atcgttaca agtgcaccc
 2521 ggtgtctggg gacacgtctc cacggcatct cagcaatgtc tccctccaccc gcaacatcg
 2581 catggtagac tccggccacgt agctgacggat ggtctgcctt ccctggccaa
 2641 gcaagggtttg tgatcaggcc ctggggccg tcaataatgg tggagaggag agaatgagag
 2701 agtgtggaaa aaaaaagaat aatgacccgg ccccccctt ctgcctccag ctgcctctg
 2761 cagttcggtt aattggtaa tcaacttaacc tgctttgtc actcggctt ggctcgcc
 2821 tccaaatca gtgtggag taagagcaaa ttcatctt ccaaattgt ggggtggctt

5881 gagccagtgt ccttgggtgg gctagatagg atatactgtt tgccggctcc ttcaagctgc
 5941 tgactcactt tatcaatagt tccattaaa ttgacttcag tggtagact gtatcgttt
 6001 tgcatttgc tggatgtgca tggggggagg ggggaggaat gtgttagata gttacatgg
 6061 gcaaagggag atcttgggtt gcagcaacta aactgcctcg taacccttt catgattca
 6121 accacatttgc ttagagggag ggagcagcca cggagtttga gccccttggg gtttcttt
 6181 tccactgaca ggcttccca ggcagctggc tagttcattt cctcccaagc caggtgcagg
 6241 ctaggaata tggacatctg gttgtttgg cttgtgtccc tcttcagg gtcctaagcc
 6301 cacaatcatg cttccctaa acettggcat cttccctt aagccgttgg cacctcttg
 6361 ccacctctca cactggctcc agacacacag cctgtgtttt tggagctgag atcactcgct
 6421 tcaacccttca cttttgttgc tcccaagttt agccacgggg tcggggcgag ggcagagggt
 6481 atcacctcg tttccatctt acagacactgc agcttcataa aacttctgtt ttctcttcag
 6541 cttgaaaag gtttaccctg ggcactggcc tagagccca cttccataa gacttagccc
 6601 catgagtttgc ccatgttgag caggactt tctggactt gcaagtttca tgatttcttc
 6661 ggttaattctg aggggtgggg gaggacatg aaatcatctt agcttagctt tctgtgttg
 6721 aatgtctata tagtgttattt tttttttttt caaatgattt acactgactg ttgtgttaaa
 6781 agtgaatttg gaaataaaatg tattactctg attaaa (SEQ ID NO: 305)

Isoforma 6 de proteína tau asociada a microtúbulos de *Homo sapiens* (NP_001116538 2)

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGLTD
 AGLKESPLQT PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA
 AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQEPESGK VVQEGFLREP
 GPPGLSHQLM SGMPGAPLLP EGPREATRQP SGTGPEDTEG GRHAPELLKH
 QLLGDLHQEG PPLKGAGGKE RPGSKEEVDE DRDVDESSPQ DSPPSKASPA
 QDGRPPQTAA REATSIPGFP AEGAIPLPVD FLSKVSTEIP ASEPDGPSVG
 RAKGQDAPLE FTFHVEITPN VQKEQAHSEE HLGRAAFPGA PEGPPEARGP
 SLGEDTKEAD LPEPSEKQPA AAPRGKPVSR VPQLKARMVS KSKDGTGSDD
 KKAKTSTRSS AKTLKNRPCL SPKHPTPGSS DPLIQPSSPA VCPEPPSSPK
 YVSSVTSRTG SSGAKEMKLK GADGKTKIAT PRGAAPPGQK GQANATRIP
 KTPPAPKTPP SSATKQVQRR PPPAGPRSER GEPPKSGDRS GYSSPGSPGT
 PGSRSRTPSL PTPPTREPDKK VAVVRTPPKS PSSAKSRLQT APVPMPLK
 VKSKIGSTEN LKHQPGGGKV QIINKKLDLS NVQSKCGSKD NIKHVPGGGS
 VQIVYKPVDL SKVTSKCGSL GNIIHHKPGGG QVEVKSEKLD FKDRVQSKIG
 SLDNITHVPG GGNKKIETHK LTFRENAKAK TDHGAEIVYK SPVVSQDTSP
 RHLSNVSSTG SIDMVDSPQL ATLADEVSAS LAKQGL (SEQ ID NO: 306)

5

Las secuencias de ARNm y proteína de las otras isoformas de tau humana pueden encontrarse en GenBank con los siguientes números de acceso:

- 10 isoforma 1 de tau: NM_016835.4 (ARNm) -> NP_058519.3 (proteína);
 isoforma 2 de tau: NM_005910.5 (ARNm) -> NP_005901.2 (proteína);
 isoforma 3 de tau: NM_016834.4 (ARNm) -> NP_058518.1 (proteína);
 15 isoforma 4 de tau: NM_016841.4 (ARNm) -> NP_058525.1 (proteína);
 isoforma 5 de tau: NM_001123067.3 (ARNm) -> NP_001116539.1 (proteína);
 20 isoforma 7 de tau: NM_001203251.1 (ARNm) -> NP_001190180.1 (proteína);
 isoforma 8 de tau: NM_001203252.1 (ARNm) -> NP_001190181.1 (proteína).

Tal como se utiliza en el presente documento, la proteína tau humana también abarca proteínas que tienen en su longitud completa al menos aproximadamente el 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% o 100% de identidad de secuencia con cualquiera de las isoformas de tau. Las secuencias de proteínas tau murinas, de macaco y de otros animales son conocidas en la técnica.

- La expresión "enfermedad asociada a tau" incluye, pero sin limitación, una enfermedad asociada con la expresión, secreción, fosforilación, escisión y/o agregación anómala de la proteína tau. Las enfermedades asociadas a tau incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Alzheimer (EA), esclerosis lateral amiotrófica/complejo de parkinsonismo-demencia (ALS-PDC), demencia argirofílica granulosa (AGD), angiopatía amiloide de tipo británico, angiopatía amiloide cerebral, 5 encefalopatía traumática crónica (CTE), degeneración corticobasal (CBD), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), demencia pugilística, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, síndrome de Down, síndrome de Dravet, epilepsia, demencia frontotemporal (FTD), demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17 (FTDP-17), degeneración lobular frontotemporal, ganglioglioma, gangliocitoma, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, enfermedad de Halervorden-Spatz, enfermedad de Huntington, miositis de cuerpos de inclusión, encefalopatía plúmbica, 10 enfermedad de Lytico-Bodig, meningioangiomatosis, atrofia multisistémica, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NP-C), enfermedad de neuronas motoras no de Guam con ovillos neurofibrilares, enfermedad de Pick (PiD), parkinsonismo postencefálico, angiopatía amiloide cerebral por proteína priónica, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva (PSP), panencefalitis esclerosante subaguda, demencia solo con ovillos, demencia predominante de ovillos, demencia multiinfarto, accidente cerebrovascular isquémico o esclerosis tuberosa.
- 15 El término "homología" o "identidad" se refiere a la identidad de secuencia de subunidad entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácido nucleico, tales como dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas polipeptídicas. Cuando una posición de subunidad en ambas moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica; por ejemplo, si una posición en cada una de dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas o idénticas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas; por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias son homólogas, las dos secuencias son el 50% homólogas; si el 90% de las posiciones (por ejemplo, 9 de 10), son coincidentes u homólogas, las dos secuencias son el 90% homólogas. El porcentaje de "identidad de secuencia" se puede determinar comparando dos secuencias alineadas óptimamente a lo largo de una ventana de comparación, pudiendo comprender el fragmento de la secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación adiciones o delecciones (por ejemplo, huecos o salientes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o delecciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. 20 El porcentaje se puede calcular determinando el número de posiciones en las que aparece el residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. El resultado es el porcentaje de identidad de la secuencia objeto 25 con respecto a la secuencia de la consulta.
- 30 El término "aislado" se refiere a alterado o retirado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido presente de forma natural en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido parcialmente o completamente separado de los materiales coexistentes en su estado natural está "aislado". Un ácido nucleico o proteína aislados pueden existir en forma sustancialmente purificada, o pueden existir en un entorno no nativo tal como, por ejemplo, una célula huésped.
- 35 40 El término "tratar" o "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, siendo el objetivo prevenir o ralentizar un cambio o trastorno fisiológico no deseado. Para el propósito de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, alivio de los síntomas, disminución de la magnitud de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado patológico y remisión (ya sea parcial o total), tanto detectable como indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en 45 comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.
- 50 El término "sujeto" se refiere a un animal, humano o no humano, al que se le proporciona el tratamiento según los procedimientos de la presente invención. Se contemplan aplicaciones veterinarias y no veterinarias. El término incluye, pero sin limitación, mamíferos, por ejemplo, seres humanos, otros primates, cerdos, roedores, tales como ratones y ratas, conejos, cobayas, hámsteres, vacas, caballos, gatos, perros, ovejas y cabras. Los sujetos típicos incluyen seres humanos, animales de granja y mascotas domésticas tales como gatos y perros.
- 55 60 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque se pueden utilizar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para poner en práctica la invención, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.
- Los detalles de una o más formas de realización de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

Oligonucleótidos antisentido

- Los oligonucleótidos antisentido (ASO) son agentes potentes y versátiles utilizados en una cantidad creciente de aplicaciones que incluyen reducción de ARN, detención de la traducción, inhibición de miARN, modulación de corte y empalme y selección de sitios de poliadenilación. Un oligonucleótido antisentido se une a un ácido nucleico diana cuando un número suficiente de nucleobases del oligonucleótido antisentido pueden formar enlaces de hidrógeno con las nucleobases correspondientes del ácido nucleico diana, y modula la transcripción y/o traducción del ácido nucleico diana. Por lo tanto, la secuencia de nucleobases de un oligonucleótido antisentido es complementaria a la secuencia de nucleobases de un ácido nucleico diana, por ejemplo, una secuencia genómica diana, pre-ARNm o molécula de ARNm. La hibridación se produce cuando se forman enlaces de hidrógeno (por ejemplo, enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso) entre las nucleobases complementarias del oligonucleótido antisentido y el ácido nucleico diana. Las nucleobases no complementarias entre un oligonucleótido antisentido y un ácido nucleico diana pueden tolerarse siempre que el oligonucleótido antisentido siga siendo capaz de hibridarse específicamente con un ácido nucleico diana.
- 15 Los ASO se pueden diseñar para disminuir la expresión de una proteína diana de maneras dependientes de RNasa H o independientes de RNasa H (véase Watts JK, et al., J Pathol. Enero de 2012; 226(2): 365-379. Cuando un ASO que comprende un tramo contiguo de ADN se hibrida con un ARN diana, el heterodíplex de ADN-ARN recluta RNasa H, que escinde el ARN diana en el dúplex y promueve la degradación posterior de los fragmentos de ARN por nucleasas celulares. Los ASO también pueden disminuir la expresión diana independientemente de la ARNasa H bloqueando estéricamente 20 el procesamiento de pre-ARNm y/o la traducción del ARNm en proteína.

En el presente documento se proporcionan oligonucleótidos antisentido dirigidos a proteína tau asociada a microtúbulos (MAPT) según las reivindicaciones.

- 25 En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en el presente documento tienen una secuencia de nucleobases que es el 100% complementaria (es decir, totalmente complementaria) a un segmento de ADN genómico de MAPT, ARNpre-m o ARNm. Tal como se utiliza en el presente documento, "totalmente complementaria" o "el 100% complementaria" se refiere a que cada nucleobase de un compuesto antisentido es capaz de realizar un emparejamiento de bases preciso con las nucleobases correspondientes de un ácido nucleico diana. Por ejemplo, un 30 compuesto antisentido de 20 nucleobases es totalmente complementario a una secuencia diana que tiene 400 nucleobases de longitud, siempre que haya una porción de 20 nucleobases correspondiente del ácido nucleico diana que sea completamente complementario al compuesto antisentido.

Modificación química de oligonucleótidos antisentido

- 35 Los oligonucleótidos consisten en unidades repetidas de nucleótidos que están unidas entre sí por enlaces fosfodiéster internucleosídicos. Cada nucleótido está compuesto por un nucleósido, que comprende una nucleobase unida a un resto de azúcar, y uno o más grupos fosfato unidos covalentemente al resto de azúcar. Los enlaces fosfodiéster están compuestos por un residuo de azúcar (ribosa para ARN o desoxirribosa para ADN, colectivamente furanosa) unido a 40 través de un enlace glicosídico a una base de purina (guanina y/o adenina) y/o pirimidina (timina y citosina para ADN; y uracilo y citosina para ARN).

- 45 Los oligonucleótidos antisentido proporcionados en el presente documento pueden contener una o más subunidades de nucleótidos y/o enlaces internucleosídicos modificados. Las modificaciones químicas en oligonucleótidos abarcan cambios en los enlaces internucleosídicos, restos de azúcar, nucleobases y/o esqueletos. Las modificaciones pueden mejorar la estabilidad, la eficacia y/o reducir la inmunogenicidad de los oligonucleótidos antisentido. Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden modificarse para que tengan una mayor resistencia a nucleasas, una mayor afinidad de unión por la diana de ácido nucleico, una mayor captación celular y/o una mayor actividad inhibidora en comparación con los oligonucleótidos no modificados.

- 50 Los enlaces fosfodiéster se modifican dando otros enlaces que contienen fósforo tales como enlace fosforotioato. En las presentes formas de realización, cada enlace internucleosídico de un oligonucleótido antisentido es un enlace internucleosídico fosforotioato.

- 55 Los oligonucleótidos antisentido proporcionados en el presente documento incluyen restos de azúcar modificados químicamente. Los oligonucleótidos antisentido incluyen una modificación en 2' en el anillo de furanosa, formación de puentes de los átomos del anillo no geminales para formar ácidos nucleicos bicíclicos (BNA), sustitución del átomo de oxígeno del anillo de azúcar por otros átomos, o combinaciones de los mismos. Un ejemplo de modificación en 2' incluye 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE).

- 60 En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en el presente documento pueden incluir la sustitución de un nucleótido en una posición dada por una versión modificada del mismo nucleótido. Por ejemplo, un nucleótido (C) puede reemplazarse por la correspondiente 5-metilcitosina.

En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en el presente documento incluyen oligonucleótidos modificados químicamente que reducen la inmunogenicidad de los oligonucleótidos. Por ejemplo, se ha demostrado que los oligonucleótidos que contienen 5-metilcitosina o modificaciones 2'-O-MOE muestran una reducción de la estimulación inmunitaria en ratones (Henry S. et al., J Pharmacol Exp Ther. Febrero de 2000; 292(2):468-79). En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en el presente documento incluyen 5-metilcitosinas en lugar de citosinas. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en el presente documento incluyen modificaciones 2'-O-MOE (representadas como *). En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en el presente documento incluyen 5-metilcitosinas y modificaciones 2' MOE.

10 **Gápmberos**

Los oligonucleótidos antisentido que comprenden un tramo contiguo de ADN pueden reclutar endonucleasa RNasa H celular para el heterodúplex ARN:ADN diana y escindir el ARN diana en el dúplex ARN:ADN. Los gápmberos son compuestos antisentido químéricos. Los compuestos antisentido químéricos contienen normalmente al menos una región modificada para conferir un aumento de la resistencia a la degradación por nucleasas, un aumento de la captación celular, un aumento de la afinidad de unión por el ácido nucleico diana y/o un aumento de la actividad inhibidora, y una segunda región que tiene nucleótidos que son químicamente diferentes de los nucleótidos de la primera región.

20 Los gápmberos tienen un segmento de hueco central que consiste en un tramo de 2'-desoxirribonucleótidos contiguos, ubicados entre dos segmentos de ala que consisten en nucleótidos modificados en los extremos 5' y 3'. El segmento de hueco sirve como sustrato para la escisión por endonucleasa RNasa H, mientras que los segmentos de ala con nucleótidos modificados confieren un aumento de la resistencia a la degradación por otras nucleasas. El segmento de ala-hueco-ala puede describirse como "X-Y-Z", en el que "X" representa la longitud del ala 5', "Y" representa la longitud del hueco, y "Z" representa la longitud del ala 3'. "X" y "Z" pueden comprender restos de azúcar uniformes, variantes o 25 alternantes.

30 En algunas formas de realización, el segmento de hueco central de un gápmero consiste en diez (10) 2'-desoxirribonucleótidos contiguos; y los segmentos de ala 5' y 3' comprenden uno o más nucleótidos modificados en 2'. Se ha descrito que un oligonucleótido químérico que comprende un tramo de hasta cuatro 2'-desoxirribonucleótidos contiguos no activa la RNasa H. Véase la patente de Estados Unidos Nº 9.157.081. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT proporcionados en el presente documento son gápmberos que comprenden diez 2'-desoxirribonucleótidos contiguos. La modificación en 2' es 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE).

35 En algunas formas de realización, los gápmberos dirigidos a MAPT son gápmberos 5-10-5 que tienen 20 nucleósidos de longitud, en los que el segmento de hueco central comprende diez 2'-desoxinucleósidos y está flanqueado por segmentos de ala 5' y 3', comprendiendo cada uno cinco nucleósidos, cada uno con una modificación en 2'.

40 En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT proporcionados en el presente documento son gápmberos que consisten en cualquiera de las secuencias de nucleobase proporcionadas en cualquiera de las tablas 11. Tal como se detalla en los ejemplos más adelante, los gápmberos se diseñaron para que se dirijan a secuencias que rodean el codón de inicio, el exón 1 o la región 3' no traducida (UTR) del transcrito de MAPT. En algunas formas de realización, los gápmberos se diseñaron para que se dirijan a 3' UTR.

45 En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT proporcionados en el presente documento son gápmberos 5-10-5 que comprenden cualquiera de las secuencias de nucleobase proporcionadas en cualquiera de las tablas 9-15 y 17, en las que del primer al quinto nucleótidos comprenden cada uno un nucleósido modificado 2'-O-MOE, en las que del sexto al decimoquinto nucleótidos comprenden cada uno un 2'-desoxinucleósido, y en las que del decimosexto al vigésimo nucleótidos comprenden cada uno un nucleósido modificado 2'-O-MOE.

50 **Secuencias genómicas de MAPT a las que se dirigen oligonucleótidos antisentido**

55 En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido se diseñan para que se dirijan a una región particular de la secuencia genómica de MAPT (número de acceso de GenBank: NG_007398.1; SEQ ID NO: 304) o una región del ARNm o transcrito de tau correspondiente (SEQ ID NO: 306). Las secuencias de intrones y exones de MAPT y los puntos de ramificación se determinaron basándose en el sitio de Internet de la base de datos de genomas de Ensembl usando Transcript: MAPT-203 ENST00000344290. El cribado de exones, intrones y uniones intrón/exón del gen MAPT humano reveló que el direccionamiento a algunas regiones en el gen o transcrito MAPT mediante oligonucleótidos antisentido es más eficaz para reducir la expresión de tau que el direccionamiento a otras regiones. Por ejemplo, la tabla 1 enumera secuencias de algunas regiones preferidas en el gen o transcrito de MAPT a las que pueden dirigirse oligonucleótidos antisentido.

60 En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en el presente documento comprenden una secuencia de nucleobases que es el 100% complementaria a la SEQ ID NO: 480.

Tabla 1: Secuencias genómicas MAPT, de ARNm o de pre-ARNm seleccionadas a las que se dirigen oligonucleótidos antisentido de tau.

Secuencias genómicas de MAPT seleccionadas (cadena antisentido) a las que se dirigen ASO de tau	SEQ ID NO	Ubicación	Secuencia de ARNm o de pre-ARNm de MAPT correspondiente a la que se dirige ASO de tau
ACGCTGGCCTGAAAGGTTAGTGGAC	292	Unión intrón/exón 1	GUCCACUAACCUUCAGGCCAGCU (SEQ ID NO: 503)
AAAAGCCAAGGTAAGCTGACGATGC	293	Unión intrón/exón 5	GCAUCGUCAGCUUACCUUGGCUUUU (SEQ ID NO: 504)
TTTATATTATTCAGCTCGCATGG	294	Unión intrón/exón 5	CCAUGCGAGCUGAUAAAAAUAAA (SEQ ID NO: 505)
ACCCACAAGCTGACCTTCG	295	Exón 13	CGGAAGGUCCAGCUUGUGGGU (SEQ ID NO: 487)
ACCAAGCTGAAGAACGAGGATTGGAGACAC	296	Exón 4	GUGUCUCAAUGCUGCUUCUUCAGCUGGU (SEQ ID NO: 488)
CTCTCATCTCCAGGTGCAAATAGTC	297	Unión intrón/exón 11	GACAUUUGCACCUUGGAGAUGAG (SEQ ID NO: 506)
ATAGTCTACAAACCAGTTGA	298	Exón 11	UCAACUGGUUUGUAGACAU (SEQ ID NO: 489)
ATTAGGCAACATCCATCATA	299	Exón 11	UAUGAUGGAUGUUGCCUAAU (SEQ ID NO: 490)
GAACCAGGATGGCTGAGCCC	300	Exón 1	GGGCUCAGCCAUCUUGGUUC (SEQ ID NO: 491)
CGTCCCTGGCGGAGGAAA	301	Exón 12	UUUCCUCCGCCAGGGACG (SEQ ID NO: 492)
TGGTCAGTAAAGCAAAGAC	302	Exón 5	GUCUUUGCUUUUACUGACCA (SEQ ID NO: 493)
CTGGAAGCGATGACAAAAAA	303	Exón 5	UUUUUUGUCAUCGCUUCCAG (SEQ ID NO: 494)
CCTTGCTCAGGTCAACTGGT	479	Exón 12	ACCAGUUGACCUGAGCAAGG (SEQ ID NO: 495)
GGTTGACATCGTCTGCCTGT	480	UTR 3'	ACAGGGCAGACGAUGUCAACC (SEQ ID NO: 496)
GTCCCACCTTGTCGCTGGA	481	UTR 3'	UCCAGGGCACAAGAGUGGGAC (SEQ ID NO: 497)

Secuencias genómicas de MAPT seleccionadas (cadena antisentido) a las que se dirigen ASO de tau	SEQ ID NO	Ubicación	Secuencia de ARNm o de pre-ARNm de MAPT correspondiente a la que se dirige ASO de tau
GACATCGTCTGCCTGTGGCT	482	UTR 3'	AGCCACAGGCAGACGAUGUC (SEQ ID NO: 498)
CCCACTCTTGTGCCTGGACT	483	UTR 3'	AGUCCAGGCACAAGAGUGGG (SEQ ID NO: 499)
GTCCCAGGTCTGCAAAGTGG	484	UTR 3'	CCACUUUGCAGACCUGGGAC (SEQ ID NO: 500)
GTCTGCCTGTGGCTCCACGA	485	UTR 3'	UCGUGGAGCCACAGGCAGAC (SEQ ID NO: 501)
AGTCACTCTGGTGAATCCAA	486	UTR 3'	UUGGAUUCACCAGAGUGACU (SEQ ID NO: 502)

Conjugados de oligonucleótidos antisentido

- 5 La conjugación de oligonucleótidos antisentido con otro resto puede mejorar la actividad, la captación celular y/o la distribución tisular de los oligonucleótidos antisentido. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido pueden estar covalentemente unidos a uno o más compuestos de diagnóstico, grupo informador, agente de reticulación, resto que confiere resistencia a nucleasas, molécula lipófila, colesterol, lípido, lectina, enlazador, esteroide, uvaol, hecgenina, diosgenina, terpreno, triterpeno, sarsasapogenina, friedelina, ácido litocólico derivatizado con epifriedelanol, vitamina, 10 biotina, carbohidrato, dextrano, tinte, pululano, quitina, quitosano, carbohidrato sintético, oligolactato 15-mérico, polímero natural, polímero de bajo o medio peso molecular, inulina, ciclodextrina, ácido hialurónico, proteína, agente de unión a proteínas, molécula de direccionamiento a integrina, policatiónico, péptido, poliamina, mimético de péptido, transferrina, cumarinas, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas y/o rodaminas.
- 15 En algunos aspectos de la divulgación, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en el presente documento están unidos a una molécula enlazadora. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en el presente documento están unidos a lípidos o colesterol. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido están unidos a liposomas neutros (NL) o nanopartículas lipídicas (LNP). Las LNP son sistemas basados en lípidos catiónicos de autoensamblaje, que pueden comprender, por ejemplo, un lípido neutro (la base del liposoma); un lípido catiónico (para la carga de oligonucleótidos); colesterol (para estabilizar los liposomas); y PEG-lípido (para estabilizar la formulación, apantallamiento de carga y circulación extendida en el torrente sanguíneo). Los liposomas neutros (NL) son partículas no catiónicas basadas en lípidos.

20 En algunos aspectos de la divulgación, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en el presente documento están unidos a un ácido graso, por ejemplo, un ácido graso omega-3 o un ácido graso omega-6. Los ácidos grasos omega-3 adecuados incluyen, por ejemplo, ácido alfa-linolénico (ALA), ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA), ácido eicosatetraenoico (ETA), ácido eicosatrienoico (ETE), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido hexadecatrienoico (HTA), ácido heneicosapentaenoico (HPA), ácido estearidónico (SDA), ácido tetracosapentaenoico y ácido tetracosahexaenoico.

Evaluación de las actividades de oligonucleótidos antisentido

25 La actividad de los oligonucleótidos antisentido puede evaluarse *in vitro* o *in vivo*. Para la evaluación *in vitro*, los ASO se pueden introducir en células cultivadas mediante transfección o electroporación. Después de un periodo de tratamiento, se puede determinar el nivel de expresión de MAPT (tau) en las células tratadas con ASO y compararlo con el nivel de expresión de MAPT (tau) en las células de control no tratadas.

30 El nivel de expresión de MAPT puede determinarse mediante cualquier procedimiento apropiado, por ejemplo, mediante la cuantificación del nivel de ARNm de MAPT, la medición de la cantidad de ADNc producido a partir de la transcripción inversa de ARNm de MAPT, o la determinación de la cantidad de proteína tau. Estos procedimientos se pueden realizar muestra por muestra o se pueden modificar para realizar un análisis de alto rendimiento.

35 El nivel de ARNm de MAPT puede detectarse y cuantificarse mediante una sonda que se hibrida específicamente con un segmento de transcripto de MAPT, por ejemplo, mediante análisis por immunotransferencia Northern. El nivel de ARNm de MAPT también puede detectarse y cuantificarse mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando un par de cebadores que reconocen el transcripto de MAPT. Se describen procedimientos generales para la PCR en MacPherson et al., PCR: A Practical Approach, IRL Press en Oxford University Press (1991)). Sin embargo, las condiciones de PCR utilizadas para cada reacción de aplicación se determinan empíricamente. Varios parámetros influyen en el éxito de una reacción, por ejemplo, la temperatura y el tiempo de hibridación, el tiempo de extensión, la concentración de Mg²⁺ y/o ATP,

el pH, y la concentración relativa de cebadores, plantillas y/o desoxirribonucleótidos. Después de la amplificación, los fragmentos de ADN resultantes pueden detectarse mediante electroforesis en gel de agarosa seguido de visualización con tinción con bromuro de etidio e iluminación ultravioleta.

5 En algunas formas de realización, el nivel de ARNm de MAPT puede detectarse y cuantificarse mediante PCR cuantitativa en tiempo real, que supervisa la amplificación de ácido nucleico diana incorporando simultáneamente un tinte o indicador detectable durante la etapa de amplificación, usando cualquier sistema de PCR en tiempo real disponible comercialmente.

10 Alternativamente, se puede añadir una marca directamente a la muestra de ácido nucleico original (por ejemplo, ARNm, poliA, ARNm, ADNc, etc.) o al producto de amplificación después de que se complete la amplificación. Los medios de unión de marcas a ácidos nucleicos son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, traducción de mellas o marcaje de extremos (por ejemplo, con un ARN marcado) mediante quinasación del ácido nucleico y posterior unión (ligadura) de un enlazador de ácido nucleico que une el ácido nucleico de muestra a una marca (por ejemplo, un fluoróforo).

15 20 Las marcas detectables adecuadas para su uso en la presente invención incluyen cualquier composición detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Las marcas útiles en la presente invención incluyen biotina para la tinción con un conjugado de estreptavidina marcado, perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™), tintes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rojo texas, rodamina, proteína fluorescente verde y similares), radiomarcas (por ejemplo, 3H, 125I, 35S, 14C o 32P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otros usados comúnmente en un ELISA) y marcas colorimétricas tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico coloreado (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Las patentes que muestran el uso de tales marcas incluyen las patentes de Estados Unidos Nº 3.817.837, 3.850.752, 3.939.350, 3.996.345, 4.277.437, 4.275.149 y 4.366.241.

25 30 35 La detección de marcas es bien conocida por los expertos en la técnica. Por lo tanto, por ejemplo, las radiomarcas pueden detectarse usando una película fotográfica o contadores de centelleo, los marcadores fluorescentes pueden detectarse usando un fotodetector para detectar la luz emitida. Las marcas enzimáticas se detectan habitualmente proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y las marcas calorimétricas se detectan simplemente visualizando la marca coloreada. Para una revisión detallada sobre los procedimientos para marcar ácidos nucleicos y detectar ácidos nucleicos hibridados marcados, véase *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 24: *Hybridization with Nucleic Acid Probes*, P. Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

40 45 50 La actividad de los oligonucleótidos antisentido también puede evaluarse midiendo los niveles de proteína tau usando los procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el nivel de proteína tau puede cuantificarse mediante análisis de transferencia Western (inmunotransferencia), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunohistoquímica, inmunoensayos, inmunoprecipitación, ensayos immunofluorescentes, inmunocitoquímica, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), radioinmunoensayos, ensayos immunoradiométricos, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), espectrometría de masas, microscopía confocal, ensayos enzimáticos o resonancia de plasmón superficial (SPR).

La actividad *in vivo* de oligonucleótidos antisentido también puede evaluarse en modelos animales. La evaluación se puede realizar en animales normales o en modelos animales con enfermedad experimental. Los oligonucleótidos antisentido pueden formularse en un diluyente farmacéuticamente aceptable y administrarse mediante una vía de administración adecuada. Después de un periodo de tratamiento, se pueden recoger muestras de tejido, por ejemplo, tejido cerebral, líquido cefalorraquídeo (LCR), médula espinal, y se puede medir el nivel de expresión de tau usando cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente. Se puede realizar análisis histológico para evaluar la estructura cerebral y/o la presencia de ovillos neurofibrilares. También pueden supervisarse y evaluarse cambios fenotípicos de los animales tratados tales como cognición o movilidad mejoradas.

Síntesis y caracterización de oligonucleótidos

55 Los oligonucleótidos monocatenarios pueden sintetizarse usando cualquier procedimiento de polimerización de ácidos nucleicos conocido en la técnica, por ejemplo, síntesis en fase sólida empleando metodología de fosforamidita (S. L. Beaucage y R. P. Iyer, *Tetrahedron*, 1993, 49, 6123; S. L. Beaucage y R. P. Iyer, *Tetrahedron*, 1992, 48, 2223), H-fosfonato, química de fosfotriéster, o síntesis enzimática. Pueden usarse sintetizadores comerciales automatizados, por ejemplo, sintetizadores de BioAutomation (Irving, Texas) o Applied Biosystems (Foster City, California). En algunas formas de realización, los oligonucleótidos monocatenarios se generan usando química de fosforamidita en fase sólida estándar, tal como se describe en *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, Estados Unidos. Los enlaces fosforotioato se pueden introducir usando un reactivo sulfurante tal como disulfuro de fenilacetilo o DTT ((dimetilamino-metiliden)amino)-3H-1,2,4-ditiazolina-3-tiona). Es bien conocido el uso de técnicas similares y amiditas modificadas disponibles comercialmente y productos de vidrio de poro controlado (CPG) tales como biotina, fluoresceína, acridina o amiditas modificadas con psoralina y/o CPG para sintetizar oligonucleótidos modificados, o marcados fluorescentemente, biotina, u otros oligonucleótidos conjugados.

- 5 El control de la calidad de los materiales de partida y productos de cada etapa de síntesis es crucial para minimizar los niveles de impurezas en el producto final. Sin embargo, dado el número de etapas de síntesis por acoplamiento y el número de acoplamientos, la presencia de impurezas es inevitable. Se pueden usar procedimientos de purificación para excluir las impurezas no deseadas del producto oligonucleotídico final. Las técnicas de purificación comúnmente usadas para oligonucleótidos monocatenarios incluyen cromatografía líquida de alto rendimiento de par iónico de fase inversa (RP-IP-HPLC), electroforesis en gel capilar (CGE), HPLC de intercambio aniónico (AX-HPLC) y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).
- 10 Después de la purificación, los oligonucleótidos pueden analizarse por espectrometría de masas y cuantificarse por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm.

Usos terapéuticos y procedimientos de tratamiento

- 15 20 Los oligonucleótidos antisentido proporcionados en el presente documento, o composiciones farmacéuticas de los mismos, pueden usarse para tratar o prevenir una enfermedad asociada a tau en un sujeto. En algunas formas de realización, la invención proporciona los oligonucleótidos antisentido tal como se describen en el presente documento, o composiciones farmacéuticas de los mismos, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada a tau en un paciente. En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido se puede administrar al sujeto a través de una vía intratecal, intracraneal, intranasal, intravenosa, oral o subcutánea.

25 30 35 Las enfermedades asociadas a tau incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Alzheimer (EA), esclerosis lateral amiotrófica/complejo de parkinsonismo-demencia (ALS-PDC), demencia argirofílica granulosa (AGD), angiopatía amiloide de tipo británico, angiopatía amiloide cerebral, encefalopatía traumática crónica (CTE), degeneración corticobasal (CBD), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), demencia pugilística, ovíos neurofibrilares difusos con calcificación, síndrome de Down, síndrome de Dravet, epilepsia, demencia frontotemporal (FTD), demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17 (FTDP-17), degeneración lobular frontotemporal, ganglioglioma, gangliocitoma, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, enfermedad de Halervorden-Spatz, enfermedad de Huntington, miositis de cuerpos de inclusión, encefalopatía plúmbica, enfermedad de Lytic-Bodig, meningioangiomatosis, atrofia multisistémica, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NP-C), enfermedad de neuronas motoras no de Guam con ovíos neurofibrilares, enfermedad de Pick (PiD), parkinsonismo postencefálico, angiopatía amiloide cerebral por proteína priónica, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva (PSP), panencefalitis esclerosante subaguda, demencia solo con ovíos, demencia predominante de ovíos, demencia multiinfarto, accidente cerebrovascular isquémico o esclerosis tuberosa.

Terapias de combinación

40 45 Los diversos oligonucleótidos descritos anteriormente pueden usarse en combinación con otros asociados de tratamiento. Por consiguiente, los procedimientos para tratar una enfermedad asociada a tau descritos en el presente documento pueden incluir además administrar un segundo agente al sujeto que necesita tratamiento. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a la proteína tau asociada a microtúbulos (MAPT) pueden usarse en combinación con un anticuerpo que se une específicamente a la proteína tau y/o un agente dirigido a beta amiloide (A β), por ejemplo, un anticuerpo que se une a A β o un inhibidor de beta-secretasa (BACE). En algunas formas de realización, se usan oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT en combinación con un anticuerpo que se une específicamente a la proteína tau. En algunas formas de realización, se usan oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT en combinación con un inhibidor de BACE.

50 55 60 El término "combinación" se refiere a una combinación fija en una forma de dosificación unitaria, o una administración combinada en la que un asociado de la presente invención y un asociado de combinación (por ejemplo, otro fármaco tal como se explica a continuación, también denominado "agente terapéutico" o "coagente") se pueden administrar independientemente al mismo tiempo o por separado dentro de intervalos de tiempo, especialmente cuando estos intervalos de tiempo permiten que los asociados de combinación muestren un efecto cooperativo, por ejemplo, sinérgico. Los componentes individuales pueden empaquetarse en un kit o por separado. Uno o ambos componentes (por ejemplo, polvos o líquidos) pueden reconstituirse o diluirse a una dosis deseada antes de la administración. Se pretende que los términos "coadministración" o "administración combinada" o similares, tal como se utilizan en la presente, abarquen la administración del asociado de combinación seleccionado a un único sujeto que lo necesite (por ejemplo, un paciente), y se pretende que incluyan pautas de tratamiento en las que los agentes no se administren necesariamente por la misma vía de administración o al mismo tiempo. El término "combinación farmacéutica", tal como se utiliza en el presente documento, significa un producto que resulta de mezclar o combinar más de un agente terapéutico e incluye combinaciones tanto fijas como no fijas de los agentes terapéuticos. El término "combinación fija" significa que los agentes terapéuticos, por ejemplo, un oligonucleótido de la presente invención y un asociado de combinación, se administran ambos a un paciente simultáneamente en forma de una única entidad o dosificación. El término "combinación no fija" significa que los agentes terapéuticos, por ejemplo, un oligonucleótido de la presente invención y un asociado de combinación, se administran ambos a un paciente como entidades separadas simultáneamente, concurrentemente o secuencialmente sin límites de tiempo específicos, proporcionando dicha administración niveles terapéuticamente

eficaces de los dos compuestos en el organismo del paciente. Esto último también se aplica a la terapia de cóctel, por ejemplo, la administración de tres o más agentes terapéuticos.

- 5 El término "combinación farmacéutica", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una combinación fija en una forma de dosificación unitaria, o una combinación no fija o un kit de partes para la administración combinada en la que se pueden administrar dos o más agentes terapéuticos independientemente al mismo tiempo o por separado dentro de intervalos de tiempo, especialmente cuando estos intervalos de tiempo permiten que los asociados de combinación muestren un efecto cooperativo, por ejemplo, sinérgico.
- 10 El término "terapia de combinación" se refiere a la administración de dos o más agentes terapéuticos para tratar una afección o trastorno terapéutico descrito en la presente divulgación. Dicha administración abarca la coadministración de estos agentes terapéuticos de una forma sustancialmente simultánea, tal como en una única cápsula que tiene una proporción fija de los principios activos. Alternativamente, dicha administración abarca la coadministración en múltiples recipientes o en recipientes separados (por ejemplo, comprimidos, cápsulas, polvos y líquidos) para cada principio activo.
- 15 20 Los polvos y/o líquidos pueden reconstituirse o diluirse a una dosis deseada antes de la administración. Además, tal administración también abarca el uso de cada tipo de agente terapéutico de una manera secuencial, ya sea aproximadamente al mismo tiempo o en momentos diferentes. En cualquier caso, la pauta de tratamiento proporcionará efectos beneficiosos de la combinación farmacológica para tratar las afecciones o trastornos descritos en el presente documento.

Preparación de una muestra

- 25 Las muestras de tejido pueden obtenerse de un sujeto tratado con oligonucleótido antisentido usando cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante biopsia o cirugía. Por ejemplo, una muestra que comprende líquido cefalorraquídeo puede obtenerse mediante punción lumbar, en la que una aguja fina unida a una jeringa se inserta en el canal espinal en el área lumbar y se crea un vacío de manera que el líquido cefalorraquídeo puede aspirarse a través de la aguja y recogerse en la jeringa. Se pueden usar imágenes de TC, ultrasonidos o un endoscopio para guiar este tipo de procedimiento.
- 30 35 La muestra puede congelarse instantáneamente y almacenarse a -80°C para su uso posterior. La muestra también puede fijarse con un fijador, tal como formaldehído, paraformaldehído o ácido acético/etanol. El ARN o la proteína se pueden extraer de una muestra fresca, congelada o fija para su análisis.

Composiciones farmacéuticas, dosificación y administración

- 40 45 También se proporcionan en el presente documento composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, que comprenden uno o más oligonucleótidos antisentido proporcionados en el presente documento. Las composiciones farmacéuticas incluyen normalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye solución salina, disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas se formulan normalmente para que sean compatibles con su vía de administración pretendida. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración intratecal, intracranial, intranasal, intravenosa, oral o subcutánea.
- 50 55 60 En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido descrito en el presente documento puede conjugarse con un anticuerpo capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (por ejemplo, un anticuerpo que se une al receptor de transferrina, insulina, leptina o factor de crecimiento similar a insulina 1) y administrarse por vía intravenosa (Evers et al., Advanced Drug Delivery Reviews 87 (2015): 90-103).
- Los procedimientos para formular composiciones farmacéuticas adecuadas son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 21^a ed., 2005; y los libros en la serie Drugs and the Pharmaceutical Sciences: a Series of Textbooks and Monographs (Dekker, NY). Por ejemplo, las soluciones o suspensiones usadas para administración parenteral, intradérmica, intratecal o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenoglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación de uso parenteral puede estar encerrada en ampollas, jeringas desechables o viales multidosis hechos de vidrio o plástico.
- Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable pueden incluir soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles, para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser

estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluididad adecuada, por ejemplo, usando un recubrimiento tal como 5 lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y usando tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro sódico en la composición. 10 La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. 15

Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son secado al vacío y liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional a 20 partir de una solución del mismo previamente esterilizada por filtración.

Las composiciones de uso oral incluyen, en general, un diluyente inerte o un vehículo comestible. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. También pueden prepararse composiciones de uso 25 oral utilizando un vehículo líquido para su uso como colutorio. Pueden incluirse agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares, pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente, tal como almidón o lactosa, un agente 30 disgregante, tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante, tal como estearato de magnesio o Sterotes; un emoliente, tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante, tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante, tal como menta, salicilato de metilo o aromatizante de naranja.

Para la administración por inhalación, los compuestos pueden administrarse en forma de un pulverizador de aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador. Los procedimientos de este tipo incluyen los descritos en la patente de Estados Unidos Nº 35 6.468.798. La administración sistémica de un compuesto terapéutico tal como se describe en la presente también puede ser por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que hay que penetrar. Dichos penetrantes en general son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede realizarse por medio del uso de pulverizadores nasales o supositorios. 40 Para administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, bálsamos, geles o cremas tal como se sabe en general en la técnica.

En una forma de realización, los compuestos terapéuticos se preparan con vehículos que protegerán los compuestos terapéuticos contra la eliminación rápida del organismo, tal como una formulación de liberación controlada, incluidos 45 implantes y sistemas de administración microencapsulados.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase o dosificador junto con instrucciones para su administración. 50

En ejemplos no limitantes, la composición farmacéutica que contiene al menos un agente farmacéutico se formula como un líquido (por ejemplo, un líquido termoestable), tal como un componente de un sólido (por ejemplo, un polvo o un polímero biocompatible biodegradable (por ejemplo, un polímero biocompatible biodegradable catiónico)), o como un componente de un gel (por ejemplo, un polímero biocompatible biodegradable). En algunas formas de realización, la al 55 menos composición que contiene al menos un agente farmacéutico se formula como un gel seleccionado del grupo de un gel de alginato (por ejemplo, alginato de sodio), un gel a base de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa o carboxietilcelulosa), o un gel a base de quitosano (por ejemplo, glicerofosfato de quitosano). Los ejemplos adicionales no limitantes de polímeros de elución de fármacos que pueden usarse para formular cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen carragenina, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, 60 dextrano en combinación con políalcohol vinílico), dextrano en combinación con políácido acrílico), políácido galacturónico), polisacárido galacturónico, políácido salácico), políácido glicólico), goma de tamarindo, goma xantana, goma de celulosa, goma guar (carboximetil-guar), pectina, políácido acrílico), políácido metacrílico), N-isopropilpoliacrilomida, polioxietileno, polioxipropileno, ácido plurónico, políácido láctico), ciclodextrina, cicloamilosa, resilina, polibutadieno, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HP MA), anhídrido maleico-alquil vinil éter,

polidepsipéptido, polihidroxibutirato, policaprolactona, polidioxanona, polietilenglicol, poliorganofosfaceno, poliorto éster, polivinilpirrolidona, polí(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), polianhídridos, polisilamina, poli-N-vinilcaprolactama y gellan.

- 5 En algunas formas de realización, la administración de oligonucleótidos antisentido a un tejido diana puede potenciarse mediante la administración mediada por vehículo, que incluye, pero sin limitación, liposomas catiónicos, ciclodextrinas, derivados de porfirina, dendrímeros de cadena ramificada, polímeros de polietilenimina, nanopartículas y microesferas (Dass CR. J Pharm Pharmacal 2002; 54(1):3-27).
- 10 Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para obtener resultados beneficiosos o deseados. Por ejemplo, una cantidad terapéutica es aquella que logra el efecto terapéutico deseado. Esta cantidad puede ser igual o diferente de una cantidad profilácticamente eficaz, que es una cantidad necesaria para prevenir la aparición de una enfermedad o síntomas de una enfermedad. Puede administrarse una cantidad eficaz en una o más administraciones, aplicaciones o dosis. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico (es decir, una dosis eficaz) depende de los compuestos terapéuticos seleccionados. Las composiciones pueden administrarse de una o más veces al día a una o más veces a la 15 semana; incluyendo una vez cada dos días. El experto en la técnica apreciará que determinados factores pueden influir en la dosificación y el tiempo necesarios para tratar eficazmente a un sujeto, incluidos, pero sin limitación, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos terapéuticos descritos en el presente documento puede incluir un único tratamiento o una serie de tratamientos.
- 20 25 La dosificación, la toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos terapéuticos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL50/DE50. Se prefieren los compuestos que muestran índices terapéuticos altos. Aunque pueden usarse compuestos que muestran efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado en diseñar un sistema de administración que dirija dichos compuestos al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por tanto, reducir los efectos secundarios.
- 30 35 40 45 50 Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden utilizar para formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de compuestos de este tipo se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en el procedimiento de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentraciones plasmáticas en circulación que incluya la CI50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición de síntomas semimáxima) tal como se determina en cultivo celular. Una información de este tipo se puede utilizar para determinar con mayor precisión dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.
- En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido descrito en el presente documento se disuelve en agua estéril, solución salina (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato) o líquido cefalorraquídeo (LCR) para la administración. En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido descrito en el presente documento es para su administración por vía intratecal, por ejemplo, mediante inyección en bolo en el espacio del disco L3 o L4 o mediante infusión usando una bomba intratecal.
- En algunas formas de realización, aproximadamente 0,001-1000 mg (por ejemplo, aproximadamente 0,1-800 mg, aproximadamente 1-600 mg, aproximadamente 10-500 mg, aproximadamente 50-450 mg, aproximadamente 80-300 mg, aproximadamente 100-200 mg) del oligonucleótido antisentido descrito en el presente documento se van a administrar a un sujeto que lo necesite.

Kits

- 55 60 También se divultan kits que incluyen uno o más oligonucleótidos antisentido descritos anteriormente e instrucciones de uso. Las instrucciones de uso pueden incluir instrucciones para el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad asociada a tau. Los kits que se proporcionan en el presente documento se pueden utilizar según cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. Los expertos en la técnica conocerán otros usos adecuados para los kits proporcionados en el presente documento y serán capaces de emplear los kits para dichos usos. Los kits que se proporcionan en el presente documento también pueden incluir un envío postal (por ejemplo, un sobre con franqueo pagado o un paquete de correos) que se puede utilizar para devolver la muestra para su análisis, por ejemplo, a un laboratorio. El kit puede incluir uno o más recipientes para la muestra, o la muestra puede estar en un vial de recogida de sangre estándar. El kit también puede incluir uno o más de un formulario de consentimiento informado, un formulario de solicitud de ensayo e instrucciones sobre cómo utilizar el kit en un procedimiento descrito en el presente documento. Los procedimientos para utilizar dichos kits también se incluyen en el presente documento. Uno o más de los formularios (por

ejemplo, el formulario de solicitud de ensayo) y el recipiente que contiene la muestra pueden codificarse, por ejemplo, con un código de barras para identificar al sujeto que proporcionó la muestra.

EJEMPLOS

5

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

10

Ejemplo 1: Materiales y procedimientos generales

15

Síntesis y purificación de los oligonucleótidos antisentido

20

Los oligonucleótidos antisentido modificados descritos en la presente invención se prepararon usando química de fosforamidita convencional en un sintetizador Mermade 192 (BioAutomation) para uso *in vitro* y en Mermade 12 (BioAutomation) para fines *in vivo*. Las fosforamiditas se disolvieron en acetonitrilo a una concentración de 0,15 M (0,08 M en Mermade 192); el acoplamiento se realizó mediante la activación de fosforamiditas mediante una solución 0,5 M de 5-etiotetrazol en acetonitrilo (0,25 M en Mermade 192). El tiempo de acoplamiento fue habitualmente de entre 3-4 minutos. La sulfuración se realizó usando una solución 0,2 M de disulfuro de fenilacetilo durante cinco minutos. La oxidación se realizó mediante una solución de yodo 0,02 M en piridina (20%)/agua (9,5%)/tetrahidrofurano (70,5%) durante dos minutos. Se realizó una formación de caperuza usando reactivos estándar de formación de caperuza. Las cadenas de oligonucleótido en crecimiento se destritaron para el siguiente acoplamiento con ácido dicloroacético al 3% en tolueno. Despues de completar las secuencias, los compuestos unidos al soporte se escindieron y se desprotegieron mediante hidróxido de amonio líquido a 65°C durante 2 horas. Las soluciones brutas obtenidas se purificaron directamente por HPLC (Akta Explorer). Las fracciones purificadas se analizaron por espectrometría de masas y se cuantificaron por UV 25 según su coeficiente de extinción a 260 nM. Las fracciones extraídas se desalan y se liofilizan a sequedad.

Evaluación *in vitro* de los oligonucleótidos antisentido

30

Se evaluaron los oligonucleótidos antisentido *in vitro* en diversas líneas celulares, incluidas, pero sin limitación, líneas celulares humanas tales como células Huh7, células Hela y células SH-SY5Y y líneas celulares de mono verde COS1. Las células se obtuvieron de proveedores comerciales (por ejemplo, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA), y se cultivaron según las instrucciones de los proveedores.

35

Los oligonucleótidos antisentido también se evaluaron en neuronas humanas derivadas de células madre embrionarias humanas (hESC), que se obtuvieron del WiCell Research Institute, Inc., ubicado en Madison, Wisconsin, Estados Unidos. Las hESC se convirtieron en células neuronales funcionales mediante la expresión forzada de neurogenina-2 (Ngn2), un factor de transcripción específico de linaje neuronal. El constructo Ngn2 se suministró a hESC usando administración lentiviral para la expresión constitutiva de rTA y la expresión inducible por tetraciclina de proteínas exógenas dirigidas por un promotor tetO. Las muestras cumplen con las Directrices para la Investigación de Células Madre Embriónarias Humanas (*Guidelines for human Embryonic Stem Cell Research*) establecidas por el Instituto del Consejo Nacional de Medicina de las Academias Nacionales (*National Council Institute of Medicine of the National Academies*) ("Directrices NAS) y las regulaciones de la Oficina para Protecciones de Investigación Humana, Departamento de Salud y Servicios Humanos (*Office for Human Research Protections, Department of Health and Human Services*) ("DHHS") para la protección de sujetos humanos (45 CFR Parte1Q).

45

Los oligonucleótidos antisentido se introdujeron en células cultivadas mediante transfección o nucleofección, cuando las células alcanzaron aproximadamente el 60-80% de confluencia en cultivo. Para la transfección, los oligonucleótidos antisentido se mezclaron con reactivo de transfección OptiFect™ (Life Tech Nº de cat. 12579-017) en el medio de cultivo celular apropiado para lograr la concentración de oligonucleótido antisentido deseada y una concentración de OptiFect™ que varía de 2 a 12 ug/ml por 100 nM de oligonucleótido antisentido. Para la nucleofección, se introdujeron los oligonucleótidos antisentido en células SH-SY5Y de neuroblastoma con el dispositivo Amaxa Nucleofector-II (Lonza, Walkersville, MD). Para evaluar la eficacia de ASO, se llevó a cabo una nucleofección en placas de 96 pocillos. La solución nucleofectora SF se seleccionó basándose en la alta viabilidad y la transfección eficaz despues de experimentos preliminares. El día de la nucleofección, se tripsinizaron cultivos confluentes al 60-80%, y se plaquearon células en cada pocillo. Se trataron neuronas humanas derivadas de hESC añadiendo oligonucleótidos antisentido 1 o 10 µM al medio que iba a captarse a través de captación pasiva.

50

Las células se recogieron 24-72 horas después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido, momento en el que se aislaron y se midieron el ARNm de tau o la proteína tau usando procedimientos conocidos en la técnica y tal como se describe en el presente documento. En general, cuando los tratamientos se realizaron en múltiples repeticiones, los datos se presentaron como el promedio de los tratamientos repetidos. La concentración de oligonucleótido antisentido usada varió de línea celular a línea celular. Los procedimientos para determinar la concentración óptima de oligonucleótidos antisentido para una línea celular particular son bien conocidos en la técnica. Los oligonucleótidos antisentido se usaron normalmente a concentraciones que variaban de 1 nM a 1.000 nM cuando se transfecaron con OptiFect; y a concentraciones que variaban de 25 nM a 20.000 nM cuando se transfecaron usando nucleofección.

La cuantificación del nivel de ARNm de MAPT (tau) se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando el sistema de PCR en tiempo real ViiA7 (Life Technologies) según las instrucciones del fabricante. Antes de la PCR en tiempo real, el ARN aislado se sometió a una reacción de transcripción inversa, que produjo ADN complementario (ADNc) que se usó 5 después como sustrato para la amplificación por PCR en tiempo real. Las reacciones de transcripción inversa y PCR en tiempo real se realizaron secuencialmente en los mismos pocillos de muestra. Se usó el kit Fastlane cell multiplex (Qiagen, Nº de cat. 216513) para lisar las células en el pocillo y transcribir de forma inversa los ARNm en ADNc directamente a partir de células cultivadas sin purificación de ARN. Los ADNc se usaron después para el análisis de expresión de tau 10 usando PCR cuantitativa en tiempo real. Los niveles de ARNm de tau determinados mediante PCR en tiempo real se normalizaron usando el nivel de expresión de un gen constitutivo cuyo nivel de expresión es constante en las células, tal como gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) humana, proteína de unión a la caja TATA (TBP) humana o hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT1) humana.

Se realizaron ensayos de expresión génica TaqMan para RT-PCR cuantitativa en tiempo real, siguiendo el protocolo 15 descrito en el kit QuantiTect Multiplex RT-PCR (Qiagen, Nº de cat. 204643) usando una reacción de RT-PCR dúplex. Se usaron sondas Taqman específicas para MAPT humana (LifeTech, ensayo ID Nº Hs00902194_m1: FAM-MGB), GAPDH humana (LifeTech, ensayo ID Nº Hs02758991_g1: VIC-MGB), TBP humana (LifeTech Nº de cat 4326322E) o HPRT1 humana (LifeTech Nº de cat. 4333768T). Las muestras se ejecutaron en el sistema de PCR en tiempo real ViiA7 (Life Technologies) siguiendo las condiciones de ciclación recomendadas para la RT-PCR dúplex. Todos los datos se 20 controlaron para establecer la cantidad de entrada de ADNc y los niveles de ARNm de tau se normalizaron a los niveles del gen de referencia endógeno. Tau y el gen de control se amplificaron en la misma reacción con eficacias de PCR altas similares, lo que permite la cuantificación relativa por el procedimiento $\Delta\Delta CT$. Los resultados se presentaron como porcentaje de ARNm de tau residual con respecto a las células de control tratadas con PBS.

25 **Evaluación *in vivo* de los oligonucleótidos antisentido**

Se evaluaron oligonucleótidos antisentido para MAPT *in vivo* mediante la administración de los ASO en el líquido 30 cefalorraquídeo (LCR) de ratones mediante administración intracerebral ventricular (ICV). Los ratones se anestesiaron con isoflurano al 5% después de lo cual el contenido de isoflurano en oxígeno/oxígeno nitroso se redujo al 1,5-2% para el mantenimiento a lo largo del procedimiento quirúrgico. La temperatura rectal se mantuvo a $36,9 \pm 1,0$ °C con calentamiento 35 homeotérmico bloqueado y sonda rectal. Los ratones anestesiados se dispusieron en un aparato estereotáxico y la piel de la cabeza se afeitó y se desinfectó con solución de povidona yodada (Betadine). Antes de la incisión, se administró a los ratones buprenorfina (Temgesic, 0,03 mg/kg, 1 ml/kg, s.c.). A continuación, se realizó una incisión para exponer el cráneo para la determinación de las coordenadas cerebrales para la inyección. La inyección (volumen total 2 μ l) se 40 administró usando una jeringa Hamilton de 10 μ l y una aguja 28 G con microbomba (Harvard Apparatus) en el ventrículo lateral derecho para todos los animales en las coordenadas siguientes: PA = +0,5 mm; ML = +1,0 mm; DV = -2,5 mm. El caudal fue de 1 μ l/min, y la aguja se dejó en su lugar durante 1 minuto después de la infusión antes de retirarla. La piel se cerró y se dejó que los ratones se recuperaran en jaulas individuales antes de devolverlos a la jaula doméstica. Se administraron dosis adicionales de buprenorfina (Temgesic, 0,03 mg/kg, 1 ml/kg, s.c.) dos veces al día durante las primeras 48 horas.

Los animales se supervisaron diariamente por técnicos de laboratorio/animales. Se supervisaron el estado general de los animales y la recuperación de heridas; y se midió diariamente el peso corporal. Al final, los animales se anestesiaron profundamente con pentobarbital sódico (60 mg/kg Membunat, Orion Pharma, Finlandia). Los ratones se sometieron a 45 punción de la cisterna magna y se recogió el LCR (3-5 μ l por ratón). Después de ello, los ratones se sometieron a punción cardiaca y se recogieron muestras de sangre. Se recogieron aproximadamente 0,4-0,5 ml de sangre en tubos anticoagulantes de plástico de lavanda K2EDTA de 500 μ l, y se centrifugaron a 2000 g durante 10 min a 4 °C y el plasma se dividió en partes alícuotas. A continuación, los ratones se decapitaron y se recogieron los cerebros y se disecaron en diferentes regiones cerebrales tales como corteza, hipocampo y cerebelo. Además, también se recogieron médulas 50 espinales.

Ejemplo de referencia 2 (no forma parte de la invención): Inhibición de la expresión de tau humana en células Huh7 por bloqueadores estéricos 2'-O-MOE 18-méricos

55 Se diseñaron bloqueadores estéricos de oligonucleótidos antisentido para que se dirigieran a las uniones intrón-exón de exones constitutivos en tau humana, los exones invariables presentes en todas las isoformas. Se diseñaron bloqueadores estéricos de oligonucleótidos antisentido para inducir la omisión exónica mediante cualquiera de: hibridación con secuencias de punto de ramificación intrónica, direccionamiento directo a sitios de corte y empalme, delimitación de secuencias intrónicas y exónicas, sitios de potenciadores exónicos de corte y empalme. Los bloqueadores estéricos dirigidos a MAPT se diseñaron inicialmente como 18 nucleósidos de longitud con modificaciones de azúcar de ribosa 2'-O-(2-metoxietil) (2'-O-MOE) en todos los nucleósidos, que actúan a través del impedimento estérico y no activan RNasa H o RISC. Los enlaces internucleosídicos en todo el documento son enlaces fosfodiéster. Se llevó a cabo un cribado no sesgado para los ASO 2'-MOE modificados uniformemente 18-méricos con esqueleto de fosfodiéster. Se realizaron análisis BLAST para cada secuencia de oligonucleótido morfolino para evitar la hibridación fuera de diana.

Se evaluaron los bloqueadores estéricos 2'-O-MOE 18-méricos dirigidos a tau *in vitro* para determinar su actividad sobre la inhibición del ARNm de tau humana. Las células Huh7 se plaquearon a una densidad de 10.000 células por pocillo y se transfecaron usando reactivo OptiFect (LifeTech Nº de cat 12579-017) con 25 nM del oligonucleótido antisentido. Despues de un periodo de tratamiento de 48 horas, se preparó directamente ADNc a partir de células cultivadas usando el kit 5 Fastlane cell multiplex (Qiagen Nº de cat. 216513). Los niveles de ARNm de tau se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real en una reacción de RT-PCR dúplex usando sondas Taqman específicas para MAPT humana (LifeTech, ensayo ID Nº Hs00902194_m1: FAM-MGB) y control endógeno de TBP humana (proteína de unión a caja TATA) (LifeTech Nº de cat. 4326322E). Todos los datos se controlaron para establecer la cantidad de ADNc introducido y los niveles de ARNm de tau se normalizaron a los niveles del gen de referencia endógeno TBP.

10 Tau y el gen de control TBP se amplificaron en la misma reacción con eficacias de PCR altas similares, lo que permite la cuantificación relativa por el procedimiento $\Delta\Delta CT$. Los resultados se presentan como porcentaje de ARNm de tau residual con respecto a las células de control tratadas con PBS. La tabla 2 muestra las actividades de esos bloqueadores estéricos 2'-O-MOE 18-méricos en células Huh7.

15 **Tabla 2:** Inhibición del ARNm de tau por bloqueadores estéricos 2'-O-MOE 18-méricos en células Huh7.

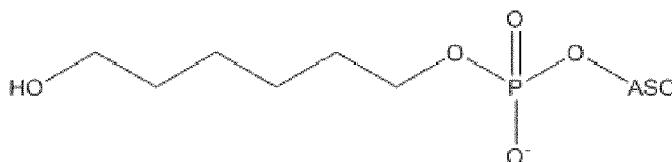
SEQ ID NO	Secuencia ASO ¹	% de ARNm residual ²
1	GTCCACTAACCTTCAGG	19,5
2	GCATCGTCAGCTTACCTT	27,7
3	TATTGACCTGGAGATG	38,4
4	GACTATTGACCTGGAG	40,8
5	CATGCGAGCTGATAAAAT	40,9
6	ACCATGCGAGCTGATAAA	41,3
7	CCATGCGAGCTGATAAAA	43,3
8	CGTCAGCTTACCTGGCT	44,1
9	TGACCATGCGAGCTGATA	47,4
10	ATGCGAGCTGATAAAATA	52,1
11	TTTGCACCTGGAGATGAG	52,3
12	TTGCACCTGGAGATGAGA	52,4
13	ATTGACCTGGAGATGA	61,9
14	TCCACTAACCTTCAGGC	68,2
15	GGTTCAATCTGCAAGAA	68,8
16	CCACTAACCTTCAGGCC	71,3
17	CACTAACCTTCAGGCCA	72,9
18	ACTAACCTTCAGGCCAG	76,7
19	GCTCAGCCATCCTGGTTC	77,3
20	GTTCAATCTGCAAGAAG	80,4
21	AGTTCACCTGGGGAAAGA	85,8
22	TTGGAGGTTCACCTGGGA	85,9
23	GGCTACCTGGTTATGAT	88,8
24	AAAGTTCACCTGGGGAAA	92,1
25	GTTCACTGACCTTGGTC	96,8
26	CAAAGTTCACCTGGGGAA	98,4
27	CAGCTTACCTGGCTTTT	99,8
28	GGGCTACCTGGTTATGA	101,6
29	TCTTCAGCTGGTGTATGT	103,4
30	TTCAAAGTTCACCTGGGG	103,4
31	CCCTTACCTTTTATT	104,7

ES 2 984 631 T3

SEQ ID NO	Secuencia ASO ¹	% de ARNm residual ²
32	TGCTTCTTCAGCTGGTGT	106,1
33	TCAGCTTACCTTGGCTTT	106,7
34	CTGCTTCTTCAGCTGGTG	107,9
35	GGCCACCTCCTAGAACAC	108,4
36	TCTTACCAAGAGCTGGGTG	108,8
37	AAGTTCACCTGGGGAAAG	109,4
38	GTCAGCTTACCTTGGCTT	109,5
39	GGGGCCTGATCACAAACC	109,7
40	AGGTTCACCTGGGAAGGA	110,2
41	GCTTACCTTGGCTTTTT	111,4
42	TCAAAGTTCACCTGGGA	111,7
43	CCACTCTACCTTCCCAC	112,8
44	CCCCCTTACCTTTTAT	113
45	GAGGTTCACCTGGGAAGG	113,3
46	GTTCACCTGGGAAGGAAG	113,6
47	CACCTCCTAGAACACAAC	114,1
48	ACTCTCACCTTCCCACCT	114,5
49	TTCAATCTGCAAGAAGAG	114,6
50	ACTGACCTTGGTCACGT	114,7
51	TTTCAATCTGCAAGAAGA	115,1
52	TTCTTACCAAGAGCTGGT	115,5
53	CAGGGCTACCTGGTTAT	116,1
54	GGGCCTGATCACAAACCC	116,5
55	AGGGCTACCTGGTTATG	117,2
56	CCACCTCCTAGAACACAA	117,6
57	CACTGACCTTGGTCACG	118,4
58	CCCCTTTACCTTTTATT	118,4
59	TTCACTGACCTTGGGTCA	118,6
60	GGCCTGATCACAAACCCCT	119,6
61	CACTCTCACCTTCCCAC	119,7
62	CCTGGCCACCTCCTAGAA	120,4
63	CCTTTACCTTTTATTTC	120,6
64	TCACTGACCTTGGGTAC	121,7
65	GCCTGATCACAAACCCCTG	122
66	CTTTACCTTTTATTTC	122,5
67	TTCTTCAGCTGGTGTATG	124
68	GCCACCTCCTAGAACACA	126,5
69	TCTCACCTTCCCACCTCC	127,4
70	CTTCTTACCAAGAGCTGGG	129,8
71	TTCTTCTTACCAAGAGCTG	131,2
72	ATCAGCCCCCTGTAAATG	131,3
73	GCTTCTTCAGCTGGTGTA	133,9

SEQ ID NO	Secuencia ASO ¹	% de ARNm residual ²
74	ACAGGGCTACCTGGTTA	134,3
75	CTCAGCCATCCTGGTTCA	134,4
76	CAGCCCCCTGTAAATGAA	136,4
77	GGGCTCAGCCATCCTGGT	137,9
78	TCTTCTTACCCAGAGCTGG	139
79	CTCTCACCTCCCGCCTC	143,1
80	TCAGCCCCCTGTAAATGA	145,9
81	CTTCTTCAGCTGGTGTAT	148
82	GGTCACCTGGGAAGGAA	153,5
83	CATCAGCCCCCTGTAAAT	156,4
84	ACCATCAGCCCCCTGTAA	157,5

1. Cada nucleótido tiene una modificación 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE); y los enlaces internucleosídicos son fosfodiésteres. Cada oligonucleótido tiene un enlazador (L1) unido al extremo 3' del ASO a través de un puente de fosfato, y tiene la estructura siguiente:



2: El % de ARNm residual es el nivel de ARNm de tau en las células Huh7 tratadas con una dosis única de 25 nM de ASO de tau durante 48 horas en comparación con el nivel de ARNm de tau en células Huh7 de control tratadas con PBS. Por ejemplo, el 19,5% de ARNm residual significa que el ASO de la SEQ ID NO: 1 tiene el 80,5% de actividad en la disminución del nivel de ARNm de tau.

Ejemplo de referencia 3 (no forma parte de la invención): Inhibición de la expresión de tau humana en células SH-SY5Y por bloqueadores estéricos 2'-O-MOE 18-méricos

5

Se seleccionaron bloqueadores estéricos que disminuyeron significativamente la expresión de tau en el ejemplo 2 y se evaluaron en células SH-SY5Y de neuroblastoma humano. Se nucleofectaron células SH-SY5Y cultivadas con 1.000 nM de un oligonucleótido antisentido seleccionado. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se preparó directamente ADNc a partir de células cultivadas usando el kit Fastlane cell multiplex (Qiagen N° de cat. 216513).

10

Los niveles de ARNm de tau se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando una reacción de RT-PCR dúplex, se usaron sondas Taqman específicas para MAPT humana (LifeTech, ensayo ID N° Hs00902194_m1: FAM-MGB) y GAPDH humana (LifeTech, ensayo ID N° Hs02758991_g1: VIC-MGB). Todos los datos se controlaron para establecer la cantidad de entrada de ADNc y los niveles de ARNm de Tau se normalizaron a los niveles del gen de referencia endógeno GAPDH. Tau y el gen de control GAPDH se amplificaron en la misma reacción con eficacias de PCR altas similares, lo que permite la cuantificación relativa por el procedimiento $\Delta\Delta CT$. Los resultados se presentan como porcentaje de ARNm de tau residual con respecto a las células de control tratadas con PBS. La tabla 3 muestra las actividades de los bloqueadores estéricos 2'-O-MOE 18-méricos en células SH-SY5Y.

15

Tabla 3: Inhibición del ARNm de tau por bloqueadores estéricos 2'-O-MOE 18-méricos en células SH-SY5Y.

ASO SEQ ID NO	% de ARNm residual ³
6	5,74
7	6,90
9	8,63
2	9,26
5	9,64
4	14,01
8	14,24

ASO SEQ ID NO	% de ARNm residual ³
10	15,75
12	26,14
3	29,40
11	34,34
1	37,95

3: El % de ARNm residual es el nivel de ARNm de tau en las células SH-SY5Y tratadas con una dosis única de 1.000 nM de ASO de tau durante 24 horas en comparación con el nivel de ARNm de tau en las células de control tratadas con PBS.

5 Los bloqueadores estéricos que mostraron una inhibición significativa *in vitro* del ARNm de tau se evaluaron a diferentes dosis. Se nucleofectaron células SH-SY5Y cultivadas con 0,125 nM, 0,25 nM, 0,5 nM, 1.000 nM, 2.000 nM, 4.000 nM y 8.000 nM de un oligonucleótido antisentido seleccionado. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se preparó directamente ADNc y se midieron los niveles de ARNm de tau mediante PCR cuantitativa en tiempo real tal como se ha descrito anteriormente. La concentración inhibitoria semimáxima (CI50) se determinó construyendo una curva de dosis-respuesta y examinando el efecto de diferentes concentraciones de oligonucleótidos antisentido sobre la reducción del ARNm de Tau. Los valores de CI50 se calcularon determinando la concentración necesaria para inhibir la mitad de la respuesta biológica máxima del compuesto y pueden usarse como una medida de la potencia del oligonucleótido antisentido. La tabla 4 muestra los valores de CI50 de los bloqueadores estéricos 2'-O-MOE 18-méricos seleccionados.

10

Tabla 4: CI50 de bloqueadores estéricos 2'-O-MOE 18-méricos seleccionados.

ASO SEQ ID NO	CI50 (nM)
7	65
5	88
6	103
2	200
4	288
10	290
12	430
3	490
11	560
1	590

15

Ejemplo de referencia 4 (no forma parte de la invención): Inhibición de la expresión de Tau humana en células SH-SY5Y por bloqueadores estéricos 2'-O-MOE 12-25-méricos

20 Se seleccionaron bloqueadores estéricos que disminuyeron significativamente la expresión de tau en los ejemplos 2 y 3 y se hizo que tuvieran diferentes longitudes de 12 a 25 nucleósidos de longitud. Estos bloqueadores estéricos 2'-O-MOE 12-25-méricos se evaluaron en células SH-SY5Y. Se nucleofectaron células SH-SY5Y cultivadas con 2.000 nM de un oligonucleótido antisentido seleccionado. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se preparó directamente ADNc y se midieron los niveles de ARNm de Tau tal como se ha descrito anteriormente. La tabla 5 muestra las actividades de los bloqueadores estéricos 2'-O-MOE 12-25-méricos en células SH-SY5Y.

25

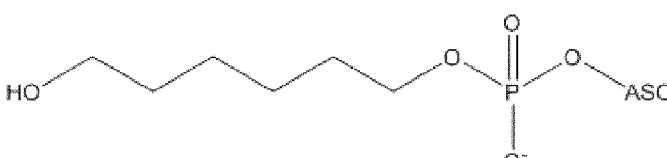
Tabla 5: Inhibición del ARNm de tau por bloqueadores estéricos 2'-O-MOE 12-25-méricos en células SH-SY5Y.

SEQ ID NO	Secuencia ASO ⁴	% de ARNm residual ⁵	Longitud de ASO	Exón de tau seleccionado como diana
85	GT ^m C ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m CAGG ^m C ^m CGTGT ^m C	61,7	25	1
86	GT ^m C ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m CAGG ^m C ^m CGTGT	61,6	24	1
87	GT ^m C ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m CAGG ^m C ^m CGTG	74,7	23	1

SEQ ID NO	Secuencia ASO ⁴	% de ARNm residual ⁵	Longitud de ASO	Exón de seleccionado como diana	tau
88	GT ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m CAGG ^m C ^m CGT	49,2	22	1	
89	GT ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m CAGG ^m C ^m CG	60,2	21	1	
90	GT ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m CAGG ^m C ^m C	60,6	20	1	
91	GT ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m CAGG ^m C	67,8	19	1	
92	GT ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m CAGG	61,6	18	1	
93	GT ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m CAG	58,7	17	1	
94	GT ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m CA	65,4	16	1	
95	GT ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m C	64,2	15	1	
96	GT ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT	72,5	14	1	
97	GT ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTT	75,3	13	1	
98	GT ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CT	87,1	12	1	
99	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m CTTGG ^m CTTT	35,4	25	5	
100	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m CTTGG ^m CTT	35,3	24	5	
101	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m CTTGG ^m CTT	37,8	23	5	
102	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m CTTGG ^m CT	38,7	22	5	
103	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m CTTGG ^m C	50,2	21	5	
104	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m CTTGG	49,5	20	5	
105	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m CTTG	42,2	19	5	
106	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m CTT	25,2	18	5	
107	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m CT	15,0	17	5	
108	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m C	10,6	16	5	
109	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C	14,4	15	5	
110	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA	11,9	14	5	
111	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTT	19,6	13	5	
112	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CT	33,8	12	5	
113	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CTGGAGATGAGAG	39,7	25	11	
114	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CTGGAGATGAGA	41,1	24	11	
115	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CTGGAGATGAG	45,7	23	11	
116	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CTGGAGATGA	54,2	22	11	
117	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CTGGAGATG	53,2	21	11	
118	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CTGGAGAT	63,6	20	11	
119	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CTGGAGA	50,6	19	11	
120	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m 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 CTGATAAAATATAAAA	14,7	24	5	

SEQ ID NO	Secuencia ASO ⁴	% de ARNm residual ⁵	Longitud de ASO	Exón de tau seleccionado como diana
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. Cada nucleótido tiene una modificación 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE); y ^mC representa 5-metilcitosina. Los enlaces internucleosídicos son fosfodiésteres. Cada oligonucleótido tiene un enlazador (L1) unido al extremo 3' del ASO a través de un puente de fosfato, y tiene la estructura siguiente:



5: El % de ARNm residual es el nivel de ARNm de tau en las células SH-SY5Y tratadas con una dosis única de 2.000 nM de ASO de tau durante 24 horas en comparación con el nivel de ARNm de tau en las células de control tratadas con PBS.

Los valores de IC_{50} de bloqueadores estéricos 2'-O-MOE 12-25-méricos seleccionados con enlaces internucleosídicos fosfodiéster se determinaron tal como se ha descrito anteriormente, y se muestran en la tabla 6.

5

Se sintetizaron varios bloqueadores estéricos 2'-O-MOE 12-25-méricos con enlaces internucleosídicos fosforotioato y los valores de IC_{50} de algunos de esos bloqueadores estéricos se muestran en la tabla 7.

10 Tabla 6: IC_{50} de bloqueadores estéricos 2'-O-MOE 12-25-méricos con enlaces internucleosídicos fosfodiéster seleccionados.

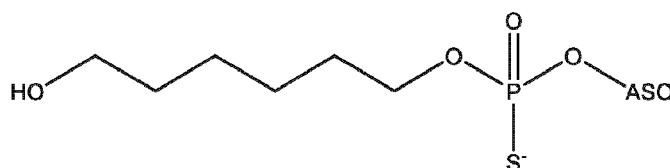
ASO SEQ ID NO	IC_{50} (nM)	Longitud de ASO
103	2728	21
105	860	19
106	1793	18
107	838	17
108	791	16
109	512	15
110	728	14
131	682	21
133	1074	19
134	1482	18
135	574	17

ASO SEQ ID NO	Cl ₅₀ (nM)	Longitud de ASO
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

Tabla 7: Cl₅₀ de bloqueadores estéricos 2'-O-MOE 12-25-méricos con enlaces internucleosídicos fosforotioato seleccionados.

SEQ ID NO	Secuencia ASO ⁵	Cl ₅₀ (nM)	Longitud de ASO
108	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTT ^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 CTT ^m C	426	15
107	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTT ^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. Cada nucleótido tiene una modificación 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE); y ^mC representa 5-metilcitosina. Los enlaces internucleosídicos son fosforotioato. Cada oligonucleótido tiene un enlazador (L1) unido al extremo 3' del ASO a través de un puente de fosfato, y tiene la estructura siguiente:



5

Ejemplo de referencia 5 (no forma parte de la invención): Inhibición de la expresión de tau humana en células SH-SY5Y por bloqueadores estéricos 2'-O-MOE 17-méricos

10 Se diseñaron bloqueadores estéricos 2'-MOE que tienen 17 nucleósidos de longitud para que se dirigieran a exones constitutivos en tau humana. Estos bloqueadores estéricos 2'-O-MOE 17-méricos se evaluaron en células SH-SY5Y. Se nucleofectaron células SH-SY5Y cultivadas con 2.000 nM de un oligonucleótido antisentido seleccionado. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se preparó directamente ADNc y se midieron los niveles de ARNm de tau tal como se ha descrito anteriormente. La tabla 8 muestra las actividades de los bloqueadores estéricos 2'-O-MOE 17-méricos en células SH-SY5Y.

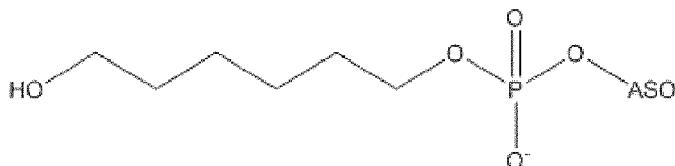
Tabla 8: Inhibición del ARNm de tau por bloqueadores estéricos MOE 17-méricos en células SH-SY5Y.

SEQ ID NO	Secuencia ASO ⁶	% de ARNm residual ⁷	Exón de tau seleccionado como diana
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

SEQ NO	ID	Secuencia ASO ⁶	% de residual ⁷	ARNm	Exón de tau seleccionado como diana
146		G ^m C ^m CAG ^m CGT ^m C ^m CGTGT ^m CA ^m C	103,6	1	
147		mC ^m CAG ^m CGT ^m C ^m CGTGT ^m CA ^m C ^m C	96,5	1	
148		mCAG ^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		mCA ^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		mCGAAG ^m CTG ^m CTGGT ^m CA ^m CG	135,5	4	
157		TTTG ^m CTTTA ^m CTGA ^m C ^m CA	18,9	5	
158		mCTTG ^m CTTTA ^m CTGA ^m C ^m C	6,8	5	
159		T ^m CTTG ^m CTTTA ^m CTGA ^m C	14,2	5	
160		GT ^m CTTG ^m CTTTA ^m CTGA	68,2	5	
161		TTTTTG ^m CATCG ^m CTT ^m C	18,5	5	
162		TTTTTG ^m CAT ^m CG ^m CTT ^m C ^m C	20,0	5	
163		TTTTGT ^m CAT ^m CG ^m CTT ^m C ^m CA	24,4	5	
164		TTTGT ^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		mCGAT ^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 C ^m CTGATTTGGAG	130,3	9	
174		GAT ^m C ^m C ^m C ^m CTGATTTGGAG	117,8	9	
175		mCGAT ^m C ^m C ^m C ^m CTGATTTGG	99,7	9	
176		G ^m CGAT ^m C ^m C ^m C ^m CTGATTTG	116,1	9	
177		G ^m C ^m CT ^m C ^m C ^m CGG ^m CTGGTG ^m CT	129,8	9	
178		mC ^m CT ^m C ^m C ^m CGG ^m CTGGTG ^m CTT	135,7	9	
179		mCT ^m C ^m C ^m CGG ^m CTGGTG ^m CTT ^m C	133,8	9	
180		T ^m C ^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		mCAA ^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		ATGATGGATGTTG ^m C ^m CTA	46,4	11	

SEQ NO	ID	Secuencia ASO ⁶	% de residual ⁷	ARNm	Exón de tau seleccionado como diana
187		TGATGGATGTTG ^m C ^m CTAA	40,9	11	
188		GATGGATGTTG ^m C ^m CTAAT	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		AGATTTA ^m CTT ^m C ^m CA ^m C ^m CT	123,1	12	
193		ATTT ^m CT ^m CT ^m C ^m CG ^m C ^m CAGGGAA	78,0	12	
194		TTT ^m C ^m CT ^m C ^m CG ^m C ^m CAGGGAA ^m CG	76,1	12	
195		TT ^m C ^m CT ^m C ^m CG ^m C ^m CAGGGAA ^m CG	71,5	12	
196		T ^m C ^m CT ^m C ^m CG ^m C ^m CAGGGAA ^m CGT	89,0	12	
197		AAGGT ^m CAG ^m CTTGTGGGT	62,1	13	
198		GAAGGT ^m CAG ^m CTTGTGGG	49,9	13	
199		GGAAGGT ^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 CAGGGAA	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. Cada nucleótido tiene una modificación 2'-O-MOE; y ^mC representa 5-metilcitosina. Los enlaces internucleosídicos son fosfodiésteres. Cada oligonucleótido tiene un enlazador (L1) unido al extremo 3' del ASO a través de un puente de fosfato, y tiene la estructura siguiente:



7: El % de ARNm residual es el nivel de ARNm de tau en las células SH-SY5Y tratadas con una dosis única de 2.000 nM de ASO de tau durante 24 horas en comparación con el nivel de ARNm de tau en las células de control tratadas con PBS.

Ejemplo 6: Inhibición de la expresión de tau humana en células Huh7 por gápmberos 5-10-5

5 Las secuencias de oligonucleótidos antisentido se diseñaron para que fueran complementarias a la isoforma más corta de Tau, variante 4 de transcripto, ARNm (GenBank: NM_016841.4). Se realizaron análisis BLAST para cada secuencia de oligonucleótido para evitar la hibridación fuera de diana. Los oligonucleótidos antisentido químéricos modificados recién diseñados se diseñaron como gápmberos 5-10-5 que tienen 20 nucleósidos de longitud, en los que el segmento de hueco central comprende diez 2'-desoxinucleósidos y está flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprenden cinco nucleósidos cada uno con una modificación de azúcar de ribosa 2'-O-MOE. Los enlaces internucleosídicos a lo largo de cada gápmero son enlaces fosforotioato (P=S).

10 15 20 Los gápmberos dirigidos a tau se evaluaron para determinar la inhibición de la expresión de ARNm de tau humana *in vitro*. Las células Huh7 se plaquearon a una densidad de 10.000 células por pocillo y se transfectaron usando reactivo OptiFect (LifeTech N° de cat 12579-017) con 25 nM del oligonucleótido antisentido. Después de un periodo de tratamiento de 48 horas, se preparó directamente ADNc a partir de células cultivadas usando el kit Fastlane cell multiplex (Qiagen N° de cat. 216513). Los niveles de ARNm de tau se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real en una reacción de RT-PCR dúplex usando sondas Taqman específicas para MAPT humana (LifeTech, ensayo ID N° Hs00902194_m1: FAM-MGB) y control endógeno de TBP humana (proteína de unión a caja TATA) (LifeTech N° de cat. 4326322E). Todos los datos se controlaron para establecer la cantidad de entrada de ADNc y los niveles de ARNm de Tau se normalizaron a los niveles

del gen de referencia endógeno TBP. Tau y el gen de control TBP se amplificaron en la misma reacción con eficacias de PCR altas similares, lo que permite la cuantificación relativa por el procedimiento $\Delta\Delta CT$. Los resultados se presentan como porcentaje de ARNm de tau residual con respecto a las células de control tratadas con PBS. La tabla 9 muestra las actividades de los gápmeros en células Huh7.

5

Tabla 9: Inhibición del ARNm de tau por gápmeros MOE 5-10-5 en células Huh7

SEQ ID NO	Secuencia ASO ⁸	% de ARNm residual 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*ACGTCCCAGCGT*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*TCCCAGCGGCA*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*CCTGCCTCCCA*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*CTGTTGGTCC*C*A*G*G*	34,9
217	G*G*G*A*C*CTGCCTCCCAG*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*TCACCCCTCTTG*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*C*G*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*ACTTGCCTTC*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*CCAGTCCCAGTC*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*GGCTTCCCTCTC*C*C*A*C*	49,4
233	G*C*G*T*C*CGTGTCAACC*C*T*T*G*	50,6
234	C*A*C*C*C*TCTTGGTCTTG*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*TCCCAGGCTGGT*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

SEQ ID NO	Secuencia ASO ⁸	% de ARNm residual ⁹
243	C*C*C*G*C*CTCCCCGGCTGG*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*CAGTCCCCTGT*T*T*G*C*	63
249	C*C*C*T*T*CTCCCACAGGC*T*G*C*C*	63,1
250	C*T*G*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*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*ACTGCCTCTGT*G*A*C*A*	69,7
261	C*C*T*G*G*CCACCTCCTGG*T*T*T*A*	70,3
262	G*G*G*T*G*CCTTGCCCTTC*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*TCAGGCCCTTCG*T*C*A*C*	74,6
265	C*T*G*mC*C*AGCTTGCCCTTC*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*CCGGCTGGTG*C*T*T*C*	78
268	C*T*G*G*C*CACCTCTGGT*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*CAGCTTGCTT*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*CTCCTCCGGCC*A*C*T*A*	112,5
283	C*C*T*T*A*CCTGCTAGCTG*G*C*G*T*	128,7

SEQ ID NO	Secuencia ASO ⁸	% de ARNm residual ⁹
8. Los nucleótidos con * tienen una modificación 2'-O-MOE; los nucleótidos sin * son 2'-desoxinucleósidos. Los enlaces internucleosídicos son fosforotioato		
9: El % de ARNm residual es el nivel de ARNm de tau en las células Huh7 tratadas con una dosis única de 25 nM de ASO de tau durante 48 horas en comparación con el nivel de ARNm de tau en células Huh7 de control tratadas con PBS.		

Ejemplo 7: Inhibición de la expresión de tau humana en células SH-SY5Y por gápmberos 5-10-5

- 5 Los gápmberos que disminuyeron significativamente la expresión de ARNm de Tau en el ejemplo 6 se seleccionaron y se evaluaron en células SH-SY5Y. Se nucleofectaron células SH-SY5Y cultivadas con oligonucleótido antisentido 2.000 nM. Despues de un periodo de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se preparó directamente ADNc a partir de células cultivadas usando el kit Fastlane cell multiplex (Qiagen Nº de cat. 216513). Los niveles de ARNm de tau se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando una reacción de RT-PCR dúplex, se usaron sondas Taqman específicas para MAPT humana (LifeTech, ensayo ID Nº Hs00902194_m1: FAM-MGB) y GAPDH humana (LifeTech, ensayo ID Nº Hs02758991_g1: VIC-MGB). Todos los datos se controlaron para establecer la cantidad de entrada de ADNc y los niveles de ARNm de Tau se normalizaron a los niveles del gen de referencia endógeno GAPDH. Tau y el gen de control GAPDH se amplificaron en la misma reacción con eficacias de PCR altas similares, lo que permite la cuantificación relativa por el procedimiento $\Delta\Delta CT$. Los resultados se presentan como porcentaje de ARNm de tau residual con respecto a las células de control tratadas con PBS. La tabla 10 muestra las actividades de gápmberos 5-10-5 seleccionados en células SH-SY5Y. Los valores de IC_{50} de gápmberos 5-10-5 seleccionados con 5-metilcitosinas se determinaron en células SH-SY5Y tal como se ha descrito anteriormente, y se muestran en la tabla 11.
- 10
- 15

Tabla 10: Inhibición del ARNm de tau por gápmberos 5-10-5 en células SH-SY5Y

ASO SEQ ID NO	% de ARNm residual 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: El % de ARNm residual es el nivel de ARNm de tau en las células SH-SY5Y tratadas con una dosis única de 2.000 nM de ASO de tau durante 24 horas en comparación con el nivel de ARNm de tau en las células de control tratadas con PBS.

20 **Tabla 11:** IC_{50} de gápmberos 5-10-5 seleccionados con 5-metilcitosina en células SH-SY5Y

SEQ ID NO	Secuencia ASO ¹¹	IC_{50} (nM)
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*G* ^m C*T* ^m CAG ^m C ^m CAT ^m C ^m CTG*G*T*T* ^m C*	268
287	G*G* ^m C*T* ^m C*T ^m C ^m C ^m CAG ^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* ^m C*	133
290	G*T* ^m C* ^m C* ^m C*A ^m CT ^m CTTGTG ^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. Los nucleótidos con * tienen una modificación 2'-O-MOE; los nucleótidos sin * son 2'-desoxinucleósidos; y ^mC representa 5-metilcitosina. Los enlaces internucleosídicos son fosforotioato

Ejemplo 8: Caracterización de oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT

- 5 Los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT se caracterizaron usando un instrumento de cromatografía líquida - espectrometría de masas (CL-EM) de alto rendimiento de Thermo Scientific. Este procedimiento se usó para confirmar las masas esperadas de oligonucleótido antisentido (ASO) y proporcionar información sobre la pureza de la muestra y la identificación de los componentes principales presentes. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido que comprende la SEQ ID NO: 284 tiene la estructura mostrada en la figura 1A y la fórmula de C230H321N72O120P19S19. Por lo tanto, el peso molecular esperado para ASO que comprende la SEQ ID NO: 284 es de aproximadamente 7212,3 Da. La figura 1B muestra que la masa de pico para ASO que comprende la SEQ ID NO: 284 medida por CL-EM es 7214,3 Da. La figura 1C muestra el informe de pico de deconvolución de CL-EM para ASO que comprende la SEQ ID NO: 284.
- 10
- 15
- 20

El oligonucleótido antisentido que comprende la SEQ ID NO: 285 tiene la fórmula de C230N69 0124 P19 S19 H318, con un peso molecular estimado de 7231,11 Da. La figura 1D muestra que la masa de pico para ASO que comprende la SEQ ID NO: 285 medida por CL-EM es 7232,5. La figura 1E muestra el informe de pico de deconvolución de CL-EM para ASO que comprende la SEQ ID NO: 285.

Ejemplo 9: Evaluación *in vivo* de gápmberos dirigidos a MAPT**Generación de ratones transgénicos de tau humana (hTau)**

Los vectores BAC (pBACe3.6) que contienen el gen tau humano MAPT se obtuvieron de bibliotecas genómicas humanas de Life Technologies. Se criaron tres vectores que se predijo que contenían todas las regiones reguladoras del gen MAPT. El ADN genómico humano se sometió a PCR estándar para analizar la presencia de cada exón, también se usaron cebadores que abarcan intrones del gen tau humano y regiones reguladoras para determinar la secuencia de los clones. La comparación con el ADN humano mostró que un clón (RP11-669E14) estaba intacto para todas las porciones del gen tau. Este vector BAC se usó para generar ratones transgénicos BAC hTau. El ADN purificado se inyectó en embriones fertilizados de ratones C57BL/6. El ADN de cola de las crías fundadoras se digirió con enzimas de restricción y se hibridó con sondas específicas de exón, usando ADN humano digerido de manera similar como control para evaluar la integridad transgénica. Las crías fundadoras positivas se expandieron. Se generaron varias líneas transgénicas BAC hTau y una línea mostró expresión de ARNm de MAPT humano y proteína (figuras 2A-2C). Esta línea expresaba los seis transcritos de cerebro humano e isoformas de proteínas encontradas en el cerebro humano (figuras 2A-2C). Los ratones transgénicos heterocigotos BAC hTau portan una copia del transgén y los niveles de expresión de ARN y tau humana son comparables a la expresión de tau murina endógena.

Silenciamiento *in vivo* de tau humana por oligonucleótidos antisentido

40 Se evaluaron oligonucleótidos antisentido seleccionados *in vivo*. Se administró a grupos de cinco ratones transgénicos BAC hTau 1, 10, 50, 200 o 400 µg de un oligonucleótido antisentido seleccionado mediante inyección en bolo intracerebroventricular (ICV), o se dejaron sin tratar como grupo de ratones de control. Todos los procedimientos se realizaron bajo anestesia con isoflurano y según las regulaciones de IACUC. Para las inyecciones en bolo ICV, el oligonucleótido antisentido se inyectó en el ventrículo lateral derecho de ratones transgénicos BAC hTau. Se inyectaron dos o cuatro microlitros de una solución de PBS que contenía 100 µg/ml de oligonucleótido. Los tejidos se recogieron inmediatamente después, 1 hora, 4 horas, 24 horas, 2 semanas, 4 semanas, 12 semanas o 24 semanas después de la administración del oligonucleótido. Se extrajo ARN del hipocampo o la corteza y se examinó para determinar la expresión de ARNm de tau humana mediante análisis de PCR en tiempo real. Los niveles de ARNm de tau humana se midieron tal como se ha descrito anteriormente. Los resultados se calcularon como porcentaje de inhibición de la expresión de ARNm de tau humana normalizado a los niveles de GAPDH en comparación con los ratones control no tratados. La proteína se extrae del hipocampo o la corteza y se examinó para determinar el nivel de expresión de la proteína tau humana por ELISA y se normalizó al nivel de proteína total.

45

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

155

160

165

170

175

180

185

190

195

200

205

210

215

220

225

230

235

240

245

250

255

260

265

270

275

280

285

290

295

300

305

310

315

320

325

330

335

340

345

350

355

360

365

370

375

380

385

390

395

400

405

410

415

420

425

430

435

440

445

450

455

460

465

470

475

480

485

490

495

500

505

510

515

520

525

530

535

540

545

550

555

560

565

570

575

580

585

590

595

600

605

610

615

620

625

630

635

640

645

650

655

660

665

670

675

680

685

690

695

700

705

710

715

720

725

730

735

740

745

750

755

760

765

770

775

780

785

790

795

800

805

810

815

820

825

830

835

840

845

850

855

860

865

870

875

880

885

890

895

900

905

910

915

920

925

930

935

940

945

950

955

960

965

970

975

980

985

990

995

1000

1005

1010

1015

1020

1025

1030

1035

1040

1045

1050

1055

1060

1065

1070

1075

1080

1085

1090

1095

1100

1105

1110

1115

1120

1125

1130

1135

1140

1145

1150

1155

1160

1165

1170

1175

1180

1185

1190

1195

1200

1205

1210

1215

1220

1225

1230

1235

1240

1245

1250

1255

1260

1265

1270

1275

1280

1285

1290

1295

1300

1305

1310

1315

1320

1325

1330

1335

1340

1345

1350

1355

1360

1365

1370

1375

1380

1385

1390

1395

1400

1405

1410

1415

1420

1425

1430

1435

1440

1445

1450

1455

1460

1465

1470

1475

1480

1485

1490

1495

1500

1505

1510

1515

1520

1525

1530

1535

1540

1545

1550

1555

1560

1565

1570

1575

1580

1585

1590

1595

1600

1605

1610

1615

1620

1625

1630

1635

1640

1645

1650

1655

1660

1665

1670

1675

1680

1685

1690

1695

1700

1705

1710

1715

1720

1725

1730

1735

1740

1745

1750

1755

1760

1765

1770

1775

1780

1785

1790

1795

1800

1805

1810

1815

1820

1825

1830

1835

1840

1845

1850

1855

1860

1865

1870

1875

1880

1885

1890

1895

1900

1905

1910

1915

1920

1925

1930

1935

1940

1945

1950

1955

1960

1965

1970

1975

1980

1985

1990

1995

2000

2005

2010

2015

2020

2025

2030

2035

2040

2045

2050

2055

2060

2065

2070

2075

2080

2085

2090

2095

2100

2105

2110

2115

2120

2125

2130

2135

2140

2145

2150

2155

2160

2165

2170

2175

2180

2185

2190

2195

2200

2205

2210

2215

2220

2225

2230

2235

2240

2245

2250

2255

2260

2265

2270

2275

2280

2285

2290

2295

2300

2305

2310

2315

2320

2325

2330

2335

2340

2345

2350

2355

2360

2365

2370

2375

2380

2385

2390

2395

2400

2405

2410

2415

2420

2425

2430

2435

2440

2445

2450

2455

2460

2465

2470

2475

2480

2485

2490

2495

2500

2505

2510

2515

2520

2525

2530

2535

2540

2545

2550

2555

2560

2565

2570

2575

2580

2585

2590

2595

2600

2605

2610

2615

2620

2625

2630

2635

2640

2645

2650

2655

2660

2665

2670

2675

2680

2685

2690

2695

2700

2705

2710

2715

2720

2725

2730

2735

2740

2745

2750

2755

2760

2765

2770

2775

2780

2785

2790

2795

2800

2805

2810

2815

2820

2825

2830

2835

2840

2845

2850

2855

2860

2865

2870

2875

2880

2885

2890

2895

2900

2905

2910

2915

2920

2925

2930

2935

2940

2945

2950

2955

2960

2965

2970

2975

2980

2985

2990

2995

3000

3005

3010

3015

3020

3025

3030

3035

3040

3045

3050

3055

3060

3065

3070

3075

3080

3085

3090

3095

3100

3105

3110

3115

3120

3125

3130

3135

3140

3145

3150

3155

3160

3165

3170

3175

3180

3185

3190

3195

3200

3205

3210

3215

3220

3225

3230

3235

3240

3245

3250

3255

3260

3265

3270

3275

3280

3285

3290

3295

3300

3305

3310

3315

3320

3325

3330

3335

3340

3345

3350

3355

3360

3365

3370

3375

3380

3385

3390

3395

3400

3405

3410

3415

3420

3425

3430

3435

3440

3445

3450

3455

3460

3465

3470

3475

3480

3485

3490

3495

3500

3505

3510

3515

3520

3525

3530

3535

3540

3545

3550

3555

3560

3565

3570

3575

3580

3585

3590

3595

3600

3605

3610

3615

3620

3625

3630

3635

3640

3645

3650

3655

3660

3665

3670

3675

3680

3685

3690

3695

3700

3705

3710

3715

3720

3725

3730

3735

3740

3745

3750

3755

3760

3765

3770

3775

3780

3785

3790

3795

3800

3805

3810

3815

3820

3825

3830

3835

3840

3845

3850

3855

3860

3865

3870

3875

3880

3885

3890

3895

3900

3905

3910

3915

3920

3925

3930

3935

3940

3945

3950

3955

3960

3965

3970

3975

3980

3985

3990

3995

4000

4005

4010

4015

4020

4025

4030

4035

4040

4045

4050

4055

4060

4065

4070

4075

4080

4085

4090

4095

4100

4105

4110

4115

4120

4125

4130

4135

4140

4145

4150

4155

4160

4165

4170

4175

4180

4185

4190

4195

4200

4205

4210

4215

4220

4225

4230

4235

4240

4245

4250

4255

4260

4265

4270

4275

4280

4285

4290

4295

4300

4305

4310

4315

4320

4325

4330

4335

4340

4345

4350

4355

4360

4365

4370

4375

4380

4385

4390

4395

4400

4405

4410

4415

4420

4425

4430

4435

4440

4445

4450

4455

4460

4465

4470

4475

4480

4485

4490

4495

4500

4505

4510

4515

4520

4525

4530

4535

4540

4545

4550

4555

4560

4565

4570

4575

4580

4585

4590

4595

4600

4605

4610

4615

4620

4625

4630

4635

4640

4645

4650

4655

4660

4665

4670

4675

4680

4685

4690

4695

4700

4705

4710

4715

4720

4725

4730

4735

4740

4745

4750

4755

4760

4765

4770

4775

4780

4785

4790

4795

4800

4805

4810

4815

4820

4825

4830

4835

4840

4845

4850

4855

4860

4865

4870

4875

4880

4885

4890

4895

4900

4905

4910

4915

4920

4925

4930

4935

4940

4945

4950

4955

4960

4965

4970

4975

4980

4985

4990

4995

5000

5005

5010

5015

5020

5025

5030

5035

5040

5045

5050

5055

5060

5065

5070

5075

5080

5085

5090

5095

5100

5105

5110

5115

5120

5125

5130

5135

5140

5145

5150

5155

5160

5165

5170

5175

5180

5185

5190

5195

5200

5205

5210

5215

5220

5225

5230

5235

5240

5245

5250

5255

5260

5265

5270

5275

5280

5285

5290

5295

5300

5305

5310

5315

5320

5325

5330

5335

5340

5345

5350

5355

5360

5365

5370

5375

5380

5385

5390

5395

5400

5405

5410

5415

Tabla 12: Inhibición del ARNm de tau y la expresión de proteínas por gápmberos 5-10-5 MOE *in vivo*

ASO ID NO	SEQ ID NO	% de ARNm de tau residual dos semanas después del tratamiento con ASO ¹²		% de proteína tau residual dos semanas después del tratamiento con ASO ¹³	
		Corteza	Hipocampo	Corteza	Hipocampo
285	35,26	33,55		50,8	91,1
284	58,8	56,77		64	100

12: El % de ARNm de tau residual es el nivel de ARNm de tau en el tejido cerebral indicado de ratones transgénicos BAC hTau dos semanas después de una única inyección ICV del ASO indicado, en comparación con el nivel de ARNm de tau en el tejido cerebral correspondiente de los ratones transgénicos BAC hTau de control que no se trajeron con ASO.

13: El % de proteína tau residual es el nivel de proteína tau en el tejido cerebral indicado de ratones transgénicos BAC hTau dos semanas después de una única inyección ICV del ASO indicado, en comparación con el nivel de proteína tau en el tejido cerebral correspondiente de los ratones transgénicos BAC hTau de control que no se trajeron con ASO.

El nivel de ARNm de tau y proteína tau también se evaluaron 4 semanas después de la única inyección ICV de los gápmberos. Los oligonucleótidos antisentido que comprenden la SEQ ID NO: 285 inhibieron significativamente la expresión de ARNm (figura 2D) y proteína tau humana (figura 2E) en el cerebro. El silenciamiento del ARNm de tau humana fue de aproximadamente el 60% tanto en la corteza como en el hipocampo para el gápmero que comprende la SEQ ID NO: 285 (figura 2D y datos no mostrados). El análisis por inmunotransferencia Western mostró que el gápmero que comprende la SEQ ID NO: 285 silenció el nivel de proteína tau humana en aproximadamente el 50% en el hipocampo 4 semanas después del tratamiento (figura 2E).

Para detectar la distribución cerebral de los oligonucleótidos antisentido en el cerebro de ratones transgénicos BAC hTau, se realizaron experimentos de hibridación *in situ* usando una sonda de ácido nucleico bloqueado marcada con digoxigenina doble (DIG) (LNA™ Exiqon). Se hibrizaron sondas de LNA de doble-DIG complementarias a oligonucleótidos antisentido diana durante la noche. Las sondas se detectaron a continuación usando un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina anti-DIG de oveja (Roche Diagnostics, N° de cat. 11093274910) y la reacción colorimétrica de nitroazul de tetrazolio conjugado con el sustrato de fosfatasa alcalina fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP). La distribución cerebral del oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO: 285 en un experimento representativo se mostró en la figura 3, que muestra la difusión inicial del ASO desde los ventrículos al parénquima cerebral de ratón y la señal de distribución no cambia entre 24 horas y 2 semanas (figura 3). El oligonucleótido antisentido es estable en el cerebro incluso después de 4 semanas (datos no mostrados).

Se observó inhibición dependiente de la dosis de la expresión de ARNm de tau humana (figura 4A) y proteína (figura 4B) en ratón transgénico BAC hTau por el oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO: 285 (figuras 4A y 4B).

El curso temporal del nivel de expresión de ARNm (figura 5A) y proteína tau humana (figura 5B) en ratones transgénicos BAC hTau después de una única inyección ICV de 200 ug del oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO: 285 mostró inhibición mantenida de la expresión de ARNm de tau y proteína tau hasta 12 semanas por el oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO: 285 (figuras 5A y 5B).

30 Ejemplo de referencia 10 (no forma parte de la invención): Inhibición de la expresión de tau humana en células Huh7 y SH-SY5Y por gápmberos 5-10-5 adicionales con 5-metilcitosina

Se evaluaron secuencias de gápmberos adicionales con 5-metilcitosina dirigidos a tau para determinar la inhibición de la expresión de ARNm de tau humana en células Huh7 y SH-SY5Y *in vitro* tal como se ha descrito anteriormente. Los resultados se presentan como porcentaje de ARNm de tau residual con respecto a las células de control tratadas con PBS. La tabla 13 muestra las actividades de secuencias cribadas adicionales de gápmberos 5-10-5 en células Huh7 y SH-SY5Y.

Tabla 13: Inhibición del ARNm de tau por gápmberos MOE 5-10-5 en células Huh7 y SH-SY5Y

SEQ ID NO	Secuencia ASO ¹⁴	% de ARNm residual en células SHSY5Y ¹⁵	% de ARNm residual en células Huh7 ¹⁶
307	G*mC*mC*mC*T*TmCTGGmCmCTGGA*G*G*G*G*	66,8	34,7
308	T*G*G*mC*mC*CTTmCTGGmCmCTG*G*A*G*G*	57,7	41,1
309	G*mC*T*G*G*TGmCTTmCAGGTT*mC*T*mC*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

SEQ ID NO	Secuencia ASO ¹⁴	% de ARNm residual en células SHSY5Y ¹⁵	% de ARNm residual en células Huh7 ¹⁶
312	T*T*G*mC*T*mCAGGTmCAA*mCTG*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	T*T*mC*T*mC*mCTmCTTmCTAmCA*T*G*G*A*	76,7	95,1
316	mC*T*T*mC*T*mCmCmCTmCTTmCTAmC*A*T*G*G*	68,2	77,6
317	mC*mC*T*T*mC*TmCmCmCTmCTTmCTAmC*A*T*G*	50,4	72,3
318	mC*A*A*A*T*mCmCTTGTGmCT*G*mC*mC*A*	33,6	54,4
319	T*mC*A*A*A*TmCmCTTGTGmC*T*G*mC*mC*	28,5	44,5
320	T*G*G*mC*T*mCmCAmCGAAmCA*mCA*mC*mC*A*A*	24,2	55,1
321	G*T*G*G*mC*TmCmCAmCGAAmCA*mCA*mC*mC*A*	22,9	51,6
322	T*G*T*G*G*mCTmCmCAmCGAAmCA*mC*A*mC*mC*	25,4	62,4
323	mC*T*G*T*G*G*mCTmCmCAmCGAAmC*A*mC*A*mC*	31,1	49,2
324	mC*mC*T*G*T*GG*mCTmCmCAmCGAA*mC*A*mC*A*	34,8	56,7
325	G*mC*mC*T*G*TGGmCTmCmCAmCGA*A*mC*A*mC*	31,4	51,3
326	T*G*mC*mC*T*GTGGmCTmCmCAmCG*A*A*mC*A*	24,2	50,2
327	mC*T*G*mC*mC*TGTGGmCTmCmCAmC*G*A*A*mC*	18,9	56,7
328	T*mC*T*G*mC*mCTGTGGmCTmCmCA*mC*G*A*A*	25,0	43,7
329	G*T*mC*T*G*mCmCTGTGGmCTmCmCA*mC*G*A*	10,1	35,5
330	mC*G*T*mC*T*GmCmCTGTGGmCTmC*mC*A*mC*G*	12,6	37,9
331	T*mC*G*T*mC*TGmCmCTGTGGmCT*mC*mC*A*mC*	9,1	44,6
332	A*T*mC*G*T*mCTGmCmCTGTGGmC*T*mC*mC*A*	18,8	55,4
333	mC*A*T*mC*G*TmCTGmCmCTGTGG*mC*T*mC*mC*	17,1	62,3
334	A*mC*A*T*mC*GTmCTGmCmCTGTG*G*mC*T*mC*	14,3	57,7
335	G*A*mC*A*T*mCGTmCTGmCmCTGT*G*G*mC*T*	11,7	33,5
336	T*G*A*mC*A*TmCGTmCTGmCmCTG*T*G*G*mC*	15,2	38,4
337	T*T*G*A*mC*ATmCGTmCTGmCmCT*G*T*G*G*	26,2	43,3
338	G*T*T*G*A*mCATmCGTmCTGmCmC*T*G*T*G*	18,0	44,5
285	G*G*T*T*G*A*mCATmCGTmCTGmC*mC*T*G*T*	17,2	42,7
339	A*G*GT*T*TGA*mCATmCGTmCTG*mC*mC*T*G*	23,4	48,9
340	A*A*G*G*T*TGA*mCATmCGTmCT*G*mC*mC*T*	17,2	38,6
341	mC*A*A*G*G*TTGA*mCATmCGTmC*T*G*mC*mC*	25,7	47,4
342	A*mC*A*A*G*GTTGA*mCATmCGT*mC*T*G*mC*	24,3	43,0
343	mC*A*mC*A*A*GGTTGA*mCATmCGT*mC*T*G*	28,9	52,9
344	A*mC*A*mC*A*AGGTTGA*mCATmC*G*T*mC*T*	23,0	51,4
345	mC*A*mC*A*mC*AAGGTTGA*mCAT*mC*G*T*mC*	33,5	78,2
346	T*mC*A*mC*A*mCAAGGTTGA*mCA*T*mC*G*T*	44,4	60,4
347	mC*T*mC*A*mC*A*mCAAGGTTGA*mC*A*T*mC*G*	35,4	67,6
348	A*mC*T*mC*A*mCAmCAAGGTTGA*mC*A*T*mC*	61,9	66,1
349	mC*A*mC*T*mC*A*mCAmCAAGGTTG*A*mC*A*T*	67,3	72,0
350	A*mC*A*mC*T*mCAmCAmCAAGGTT*G*A*mC*A*	64,0	72,7
351	mC*A*mC*A*mC*TmCAmCAmCAAGGT*T*G*A*mC*	46,3	64,8

SEQ ID NO	Secuencia ASO ¹⁴	% de ARNm residual en células SHSY5Y ¹⁵	% de ARNm residual en células Huh7 ¹⁶
352	T*mC*A*mC*A*mCTmCA*mCA*mCAAGG*T*T*G*A*	55,9	73,2
353	G*T*mC*A*mC*A*mCTmCA*mCA*mCAAGG*T*T*G*	31,9	53,3
354	mC*G*T*mC*A*mCA m CTmCA*mCA*mCAA*G*G*T*T*	29,1	57,6
355	mC*mC*G*T*mC*A*mCA*mCTmCA*mCA*A*G*G*T*	33,5	57,7
356	mC*mC*mC*mC*G*TmCA*mCA*mCTmCA*mCA*mC*A*A*G*	33,3	70,1
357	mC*mC*mC*T*T*mCTmCmC*mCA*mCAGG*mC*T*G*mC*mC*	40,3	65,4
358	mC*A*T*mC*A*AGGTmCAGTmCTT*T*T*mC*T*	43,5	61,8
359	mC*mC*A*A*mC*mCTTmCAGAA*mCTmC*A*A*T*A*	30,7	71,0
360	T*mC*mC*A*A*mC*mCTTmCAGAA*mCT*mC*A*A*T*	30,7	77,6
361	T*T*mC*mC*A*A*mCTTmCAGAA*mC*T*mC*A*A*	29,7	66,5
362	G*T*T*mC*mC*AA*mCTTmCAGAA*mC*T*mC*A*	22,9	72,7
363	A*G*T*T*mC*mCAAmCmCTTmCAGA*A*mC*T*mC*	47,6	66,5
364	mC*A*G*T*T*mCmCAAmCmCTTmCAG*A*A*mC*T*	63,6	70,0
365	G*mC*A*G*T*TmCmCAAmCmCTTmCA*G*A*A*mC*	28,6	47,6
366	G*T*mC*mC*mC*AGGTmCTGmCAAA*G*T*G*G*	18,1	41,7
367	A*A*G*T*mC*mCmCAGGTmCTGmCA*A*A*G*T*	48,5	68,1
368	A*A*A*G*T*mCmCmCAGGTmCTGmC*A*A*A*G*	53,0	73,7
369	G*G*mC*A*mC*AAGTmCmCTTAmCA*A*A*G*A*	43,7	80,9
370	A*G*G*mC*A*mCAAGTmCmCTTAmC*A*A*A*G*	41,8	76,8
371	T*mC*A*mC*mC*mCTmCAGTATGGA*G*T*A*G*	35,8	67,9
372	T*T*mC*A*mC*mCmCTmCAGTATGG*A*G*T*A*	35,7	58,3
373	T*T*T*mC*A*mCmCmCTmCAGTATG*G*A*G*T*	33,9	65,5
374	A*T*T*T*mC*A*mCmCTmCAGTAT*G*G*A*G*	51,1	54,0
375	A*A*T*T*T*mCA*mCmCTmCAGTA*T*G*G*A*	86,4	67,7
376	mC*mC*T*T*A*ATTTmCAmCmCmCTmC*A*G*T*A*	35,6	72,8
377	mC*mC*mC*T*T*AATTTmCAmCmCmCT*mC*A*G*T*	32,4	60,4
378	T*mC*mC*mC*T*TAATTTmCAmCmCmCT*mC*A*G*	26,7	71,7
379	T*T*mC*mC*mCTTAATTTmCAmCmCmC*mC*T*mC*A*	20,4	73,9
380	mC*T*T*mC*mC*mCTTAATTTmCAmCmCmC*mC*T*mC*	28,1	86,4
381	A*mC*T*mC*T*TGTGmCmCTGGAmC*T*T*T*G*	32,4	44,6
382	mC*A*mC*T*mC*TTGTGmCmCTGGAmC*T*T*T*	33,4	58,2
383	mC*mC*A*mC*T*mCTTGTGmCmCTGG*A*mC*T*T*	26,8	68,5
384	mC*mC*mC*A*mC*TmCTTGTGmCmCTG*G*A*mC*T*	16,5	43,4
385	T*mC*mC*mC*A*mCTmCTTGTGmCmCT*G*G*A*mC*	10,6	38,9
386	G*T*mC*mC*mC*A*mCTmCTTGTGmCmC*T*G*G*A*	23,0	37,4
387	G*G*T*mC*mC*mCAmCTmCTTGTGmC*mC*T*G*G*	31,0	36,9
388	G*G*G*T*mC*mCmCAmCTmCTTGTG*mC*mC*T*G*	45,9	47,5
389	G*T*G*mC*mC*mCTGGmCTmCAmCAT*mC*T*G*T*	42,8	81,7
390	A*G*T*G*mC*mCmCTGGmCTmCAmCA*T*mC*T*G*	28,1	51,0
391	mC*A*G*T*G*mCmCmCTGGmCTmCAmC*A*T*mC*T*	49,1	85,8
392	G*mC*A*G*T*G*mCmCmCTGGmCTmCA*mC*A*T*mC*	34,4	65,8

SEQ ID NO	Secuencia ASO ¹⁴	% de ARNm residual en células SHSY5Y ¹⁵	% de ARNm residual en células Huh7 ¹⁶
393	A*G*mC*A*G*TG*mCmCTGG*mCTmC*A*mC*A*T*	40,5	72,6
394	T*G*A*G*mC*AGTG*mCmCTGG*mC*T*mC*A*mC*	91,8	57,9
395	G*mC*A*T*G*G*mCTT*mCmCAG*mCTG*G*G*A*mC*	38,5	60,3
396	A*G*mC*T*G*mCTmCmCAG*mCAGAA*mC*A*G*A*	80,8	78,5
397	T*A*T*A*T*GTT*mCAG*mCTGmCT*mC*mC*A*G*	89,9	63,2
398	G*T*A*T*A*TGTT*mCAG*mCTG*mCT*mC*mC*A*	55,2	64,3
399	T*G*T*A*T*ATGTT*mCAG*mCTG*mC*T*mC*mC*	59,9	74,6
400	G*mC*A*G*G*G*mCAA*mCAT*mCTAT*G*T*A*T*	58,3	73,2
401	G*G*mC*A*G*GG*mCAA*mCAT*mCTA*T*G*T*A*	61,5	74,5
402	G*G*G*mC*A*GGG*mCAA*mCAT*mCT*A*T*G*T*	48,1	68,0
403	T*mC*A*mC*T*mCTGGTGAAT*mCmC*A*A*G*mC*	21,9	54,5
404	G*T*mC*A*mC*T*mCTGGTGAAT*mC*mC*A*A*G*	13,8	61,3
405	A*G*T*mC*A*mCT*mCTGGTGAAT*mC*mC*A*A*	15,1	55,2
406	T*A*G*T*mC*A*mCT*mCTGGTGAAT*mC*mC*A*	36,7	70,9
407	A*T*A*G*T*mCA*mCT*mCTGGTGA*A*T*mC*mC*	42,4	76,6
408	mC*A*T*A*G*T*mCA*mCT*mCTGGTG*A*A*T*mC*	57,0	77,2
409	T*mC*A*T*A*GT*mCA*mCT*mCTGGT*G*A*A*T*	45,8	65,5
410	mC*T*G*G*T*mCT*mCTGTTGGGT*mC*mC*mC*A*	37,2	60,5
411	A*T*mC*mC*T*GTG*mCTT*mCAGG*mC*mC*T*T*mC*	31,2	66,6
412	A*A*T*mC*mC*TGTG*mCTT*mCAGG*mC*mC*T*T*	41,2	73,5
413	mC*T*A*A*T*mC*mCTGTG*mCTT*mCA*G*G*mC*mC*	38,7	65,1
414	mC*mC*T*A*A*T*mC*mCTGTG*mCTT*mC*A*G*G*mC*	31,9	64,8
415	T*mC*mC*T*A*AT*mC*mCTGTG*mCTT*mC*A*G*G*	45,9	73,6
416	G*T*mC*mC*T*AAT*mC*mCTGTG*mCT*T*mC*A*G*	50,0	80,9
417	A*G*T*mC*mC*TAAT*mC*mCTGTG*mC*T*T*mC*A*	51,9	77,1
418	mC*A*G*T*mC*mCTAAT*mC*mCTGTG*mC*T*T*mC*	53,2	68,4
419	T*mC*A*G*T*mC*mCTAAT*mC*mCTGT*G*mC*T*T*	58,9	78,3
420	T*T*mC*A*G*T*mC*mCTAAT*mC*mCTG*T*G*mC*T*	51,1	72,9
421	mC*T*T*mC*A*GT*mC*mCTAAT*mC*mCT*G*T*G*mC*	49,4	69,1
422	G*mC*T*T*mC*AGT*mC*mCTAAT*mC*mC*T*G*T*G*	39,5	56,8
423	G*G*A*G*T*TGTAAG*mC*mCT*mC*T*T*T*G*	61,8	66,4
424	G*mC*T*mC*T*GGT*mCAAGG*mCTT*T*G*G*G*	33,8	49,8
425	T*G*mC*T*mC*TGGT*mCAAGG*mCT*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*mC*T*mCATGG*mCAG*mCAG*A*T*G*G*	87,5	84,7
430	T*G*mC*T*G*AGTTT*mCTTAG*G*mC*A*G*	61,8	94,7
431	mC*T*G*mC*T*GAGTTT*mCTTA*G*G*mC*A*	51,5	61,1
432	G*mC*T*G*mC*TGAGTTT*mCTTT*A*G*G*G*mC*	46,5	94,4
433	G*G*mC*T*G*mCTGAGTTT*mCTT*T*A*G*G*G*	61,8	80,4

SEQ ID NO	Secuencia ASO ¹⁴	% de ARNm residual en células SHSY5Y ¹⁵	% de ARNm residual en células Huh7 ¹⁶
434	A*G*G*mC*T*GmCTGAGTTTmCT*T*T*A*G*	68,1	74,7
435	G*A*G*G*mC*TGmCTGAGTTTmC*T*T*T*A*	52,3	83,7
436	T*TG*A*G*G*mCTGmCTGAGTTT*mC*T*T*T*	62,3	71,5
437	mC*T*G*mC*mC*AAGTmCmCmCTmCAG*G*G*T*T*	43,3	74,6
438	A*mC*T*G*mC*mCAAGTmCmCmCTmCA*G*G*G*T*	53,4	78,8
439	T*A*mC*T*G*mCmCAAGTmCmCmCTmC*A*G*G*G*	34,5	74,9
440	mC*T*A*mC*T*GmCmCAAGTmCmCmCT*mC*A*G*G*	35,4	73,6
441	T*mC*T*A*mC*TGmCmCAAGTmCmCmC*T*mC*A*G*	65,7	84,0
442	T*T*mC*T*A*mCTGmCmCAAGTmCmC*mC*T*mC*A*	47,9	93,1
443	T*T*T*A*mCTGmCmCAAGTmC*mC*T*mC*	53,6	85,3
444	A*T*T*T*mQ*TA*mCTGmCmCAAGT*mC*mC*mC*T*	72,4	100,6
445	G*A*T*T*T*mCTA*mCTGmCmCAAG*T*mC*mC*mC*	68,6	79,7
446	G*G*A*T*T*T*mCTA*mCTGmCmCAA*G*T*mC*mC*	72,1	88,6
447	T*G*G*A*T*TT*mCTA*mCTGmCmCA*A*G*T*mC*	65,7	79,7
448	mC*T*G*G*A*TTT*mCTA*mCTGmCmC*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*mCT*G*A*T*mC*	51,0	76,2
452	A*T*T*T*A*T*mCTGmCmCAGmCA*mC*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*mCmCTAT*mCTAGmCmC*mC*mC*	60,1	88,2
455	G*T*A*T*A*T*mCmCTAT*mCTAGmCmC*mC*A*mC*	64,2	85,2
456	A*G*T*A*T*AT*mCTAT*mCTAG*mC*mC*mC*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*mCmCmCTGA*A*A*G*A*	59,8	71,1
460	G*G*mC*A*T*GATTGTGGGmCT*T*A*G*G*	32,3	51,6
461	A*G*G*mC*A*TGATTGTGGGmC*T*T*A*G*	31,0	60,2
462	G*T*A*A*mC*mCmCTTTTmCAAAG*mC*T*G*A*	50,2	63,6
463	G*G*T*A*A*mCmCmCTTTTmCAAAG*mC*T*G*	27,1	51,9
464	G*G*G*T*A*A*mCmCTTTTmCAA*A*G*mC*T*	45,6	64,5
465	A*G*G*G*T*AA*mCmCTTTTmCA*A*A*G*mC*	60,3	61,5
466	mC*A*G*G*G*TAA*mCmCTTTTmC*A*A*A*G*	59,2	82,8
467	mC*mC*A*G*G*GTAA*mCmCmCTTTT*mC*A*A*A*	48,5	57,9
468	mC*mC*mC*A*G*GGTAA*mCmCmCTTT*T*mC*A*A*	37,8	70,2
469	G*mC*mC*mC*A*GGGTAA*mCmCmCTT*T*T*mC*A*	31,9	58,2
470	T*TG*mC*T*mC*AA*mCATGGmCAA*mC*T*mC*A*	42,1	70,5
471	T*mC*mC*T*TG*mCTmCAA*mCATGGmC*A*A*A*mC*	45,2	77,7
472	G*T*mC*mC*T*GmCTmCAA*mCATGG*mC*A*A*A*	42,9	64,0

14. Los nucleótidos con * tienen una modificación 2'-O-MOE; los nucleótidos sin * son 2'-desoxinucleósidos; y ^mC representa 5-metilcitosina. Los enlaces internucleosídicos son fosforotioato

SEQ ID NO	Secuencia ASO ¹⁴	% de ARNm residual en células SHSY5Y ¹⁵	% de ARNm residual en células Huh7 ¹⁶
15. El % de ARNm residual es el nivel de ARNm de tau en las células SH-SY5Y tratadas con una dosis única de 2.000 nM de ASO de tau durante 24 horas en comparación con el nivel de ARNm de tau en las células de control tratadas con PBS.			
16. El % de ARNm residual es el nivel de ARNm de tau en las células Huh7 tratadas con una dosis única de 25 nM de ASO de tau durante 48 horas en comparación con el nivel de ARNm de tau en células de control tratadas con PBS.			

Los gápmberos que disminuyeron significativamente la expresión de ARNm de Tau en la tabla 13 se seleccionaron y se evaluaron en células SH-SY5Y. Los valores de CI50 de gápmberos 5-10-5 seleccionados con 5-metilcitosinas se determinaron en células SH-SY5Y tal como se ha descrito anteriormente, y se muestran en la tabla 14.

Tabla 14: CI50 de gápmberos 5-10-5 seleccionados con 5-metilcitosina en células SH-SY5Y

SEQ ID NO	Secuencia ASO ¹⁷	CI50 (nM)
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*G*mCmCTGTGGmCTmCmC*A*mC*G*A*	481
330	mC*G*T*mC*T*G*mCmCTGTGGmCTmC*mC*A*mC*G*	555
331	T*mC*G*T*mC*TGmCmCTGTGGmCT*mC*mC*A*mC*	818
332	A*T*mC*G*T*mCTGmCmCTGTGGmC*T*mC*mC*A*	918
333	mC*A*T*mC*G*TmCTGmCmCTGTGG*mC*T*mC*mC*	981
334	A*mC*A*T*mC*GTmCTGmCmCTGTG*G*mC*T*mC*	608
335	G*A*mC*A*T*mCGTmCTGmCmCTGT*G*G*mC*T*	414
336	T*G*A*mC*A*TmCGTmCTGmCmCTG*T*G*G*mC*	393
338	G*T*T*G*A*mCATmCGTmCTGmCmC*T*G*T*G*	588
340	A*A*G*GT*TGA*mCATmCGTmCT*G*mC*mC*T*	496
366	G*T*mC*mC*mC*AGGTmCTGmCAAA*G*T*G*G*	793
384	mC*mC*mC*A*mC*TmCTTGTGmCmCTG*G*A*mC*T*	810
385	T*mC*mC*mC*A*mCTmCTTGTGmCmCT*G*G*A*mC*	954
404	G*T*mC*A*mC*TmCTGGTGAATmC*mC*A*A*G*	12035
405	A*G*T*mC*A*mCTmCTGGTGAAT*mC*mC*A*A*	743
381	A*mC*T*mC*T*TGTGmCmCTGGA*mC*T*T*G*	2737

17. Los nucleótidos con * tienen una modificación 2'-O-MOE; los nucleótidos sin * son 2'-desoxinucleósidos; y ^mC representa 5-metilcitosina. Los enlaces internucleosídicos son fosforotioato

10 Ejemplo 11: Inhibición de la expresión de tau de mono y humana por oligonucleótidos antisentido con 5-metilcitosina

15 Algunos gápmberos que disminuyeron significativamente la expresión de ARNm de Tau se seleccionaron y se evaluaron en células de mono verde COS1. Los resultados se presentan como porcentaje de ARNm de tau residual con respecto a las células de control tratadas con PBS. La tabla 15 muestra las actividades de gápmberos 5-10-5 seleccionados en células COS1.

Tabla 15: Inhibición del ARNm de tau de mono verde por gápmberos MOE 5-10-5 en células Cost

SEQ ID NO	Secuencia ASO ¹⁸	% de ARNm de tau residual ¹⁹
285	G*G*T*T*G*A*mCATmCGTmCTGmC*mC*T*G*T*	39
284	mC*mC*G*T*A*mCGTmCmCmCAGmCGT*G*A*T*mC*	61

SEQ ID NO	Secuencia ASO ¹⁸	% de ARNm de tau residual ¹⁹
473	^m C* ^m C* ^m C*G*T ^A CGT ^m C ^m CAG ^m CG*T ^G A*T*	62
474	G*G* ^m C* ^m C*A*G ^m CGT ^m C ^m CGTGT ^m C*A* ^m C* ^m C*	64
386	G*T ^m C* ^m C* ^m C*A ^m CT ^m CTTGTG ^m C ^m C*T ^G G*A*	53
335	G*A* ^m C*A*T ^m CGT ^m CTG ^m C ^m CTGT ^m G*G* ^m C*T*	39
384	^m C* ^m C* ^m C*A* ^m C*T ^m CTTGTG ^m C ^m CTG ^m G*A* ^m C*T*	51
313	^m C* ^m C*T ^T G* ^m CT ^m CAGGT ^m CAA ^m C*T ^G G*T*	37
366	G*T ^m C* ^m C* ^m C*AGGT ^m CTG ^m CAA ^A *G*T ^G G*	35
329	G*T ^m C*T ^G ^m C ^m CTGTGG ^m CT ^m C ^m C*A* ^m C*G*A*	34
405	A*G*T ^m C*A* ^m CT ^m CTGGTGAAT ^m C* ^m C*A*A*	37

18. Los nucleótidos con * tienen una modificación 2'-O-MOE; los nucleótidos sin * son 2'-desoxinucleósidos; y ^mC representa 5-metilcitosina. Los enlaces internucleosídicos son fosforotioato

19. El % de ARNm residual es el nivel de ARNm de tau en las células Cos1 tratadas con una dosis única de 2.000 nM de ASO de tau durante 24 horas en comparación con el nivel de ARNm de tau en las células de control tratadas con PBS.

5 Algunos oligonucleótidos antisentido que disminuyeron significativamente la expresión de ARNm de Tau se seleccionaron y se evaluaron en neuronas derivadas de células madre embrionarias humanas (hESC). Los resultados se presentan como porcentaje de ARNm de tau residual con respecto a las células de control tratadas con PBS. La tabla 16 muestra las actividades de oligonucleótidos antisentido seleccionados en neuronas humanas.

Tabla 16: Inhibición de neuronas derivadas de hESC de la expresión de tau humana mediante ASO de tau seleccionado

SEQ ID NO	Secuencia ASO ²⁰	% de ARNm residual ²¹
285	G*G*T*T*G* ^A CGT ^m CGT ^m CTG ^m C* ^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 A*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 ^T G* ^m C*T ^T T ^T A* ^m C*T ^G A* ^m C* ^m C*	16,2
478	T* ^m C*A*A* ^m C*T ^G G*T ^T T ^T G*T ^A G*A* ^m C*	34,9

20. Los nucleótidos con * tienen una modificación 2'-O-MOE; los nucleótidos sin * son 2'-desoxinucleósidos; y ^mC representa 5-metilcitosina. Los enlaces internucleosídicos son fosforotioato

21. El % de ARNm residual es el nivel de ARNm de tau en las neuronas derivadas de hESC tratadas con una dosis única de 10 μ M de ASO de tau durante 10 a 14 días en comparación con el nivel de ARNm de tau en células de control tratadas con PBS.

10

Ejemplo de referencia 12 (no forma parte de la invención): Evaluación *in vivo* de gápmberos dirigidos a MAPT

15

La actividad *in vivo* de los gápmberos 5-10-5 seleccionados se evaluó usando los procedimientos descritos en el ejemplo 9. Tal como se muestra en la tabla 17, algunos oligonucleótidos antisentido inhibieron significativamente el ARNm de tau humana y la expresión de proteínas en la corteza y el hipocampo.

Tabla 17: Inhibición del ARNm de tau y la expresión de proteínas por gápmberos MOE 5-10-5 *in vivo*

SEQ ID NO	Dosis (ug)	Duración del tratamiento (semanas)	% de ARNm de tau residual después del tratamiento con ASO ²²	% de proteína tau residual después del tratamiento con ASO ²³	
				Corteza	Hipocampo
284	200	4	56	61	98
473	200	4	76	44	73
474	200	4	48	26	73
386	200	4	50	48	69

SEQ ID NO	Dosis (ug)	Duración tratamiento (semanas)	del	% de ARNm de tau residual después del tratamiento con ASO ²²		% de proteína tau residual después del tratamiento con ASO ²³	
				Corteza	Hipocampo	Corteza	Hipocampo
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: El % de ARNm de tau residual es el nivel de ARNm de tau en el tejido cerebral indicado de ratones transgénicos BAC hTau cuatro semanas después de una única inyección ICV del ASO indicado, en comparación con el nivel de ARNm de tau en el tejido cerebral correspondiente de los ratones transgénicos BAC hTau de control que no se trataron con ASO.

23: El % de proteína tau residual es el nivel de proteína tau en el tejido cerebral indicado de ratones transgénicos BAC hTau cuatro semanas después de una única inyección ICV del ASO indicado, en comparación con el nivel de proteína tau en el tejido cerebral correspondiente de los ratones transgénicos BAC hTau de control que no se trataron con ASO.

24: N/T significa no evaluado

A menos que se definan de otra forma, las expresiones y los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que los que normalmente entiende un especialista familiarizado con el campo al que pertenece la divulgación.

5

A menos que se indique lo contrario, todos los procedimientos, etapas, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle se pueden realizar y se han realizado de una manera conocida de por sí, como resultará evidente para el experto en la técnica. Se hace referencia de nuevo, por ejemplo, a los manuales estándares y a los antecedentes generales de la técnica mencionados en el presente documento y a las referencias adicionales citadas en los mismos.

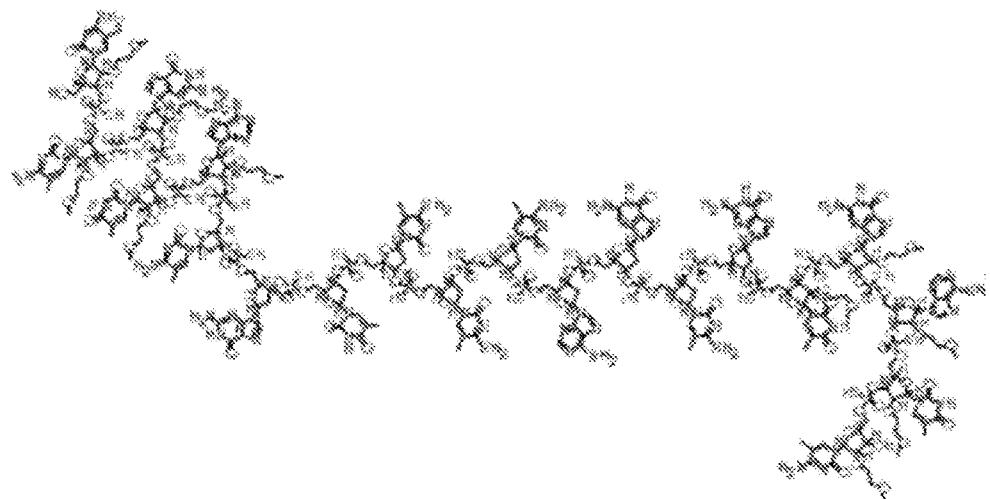
10

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleobases que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con:
 5 GGTTGACATC GTCTGCCTGT (SEQ ID NO: 208 o SEQ ID NO: 285)
 en el que C en cualquiera de las secuencias de nucleobases es citosina o 5-metilcitosina, y en el que al menos un nucleótido del oligonucleótido tiene una modificación en 2'.
 10 2. El oligonucleótido de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido comprende una secuencia de nucleobase que tiene al menos el 95% de identidad de secuencia con:
 GGTTGACATC GTCTGCCTGT (SEQ ID NO: 208 o SEQ ID NO: 285)
 15 3. El oligonucleótido de la reivindicación 2, en el que el oligonucleótido comprende una secuencia de nucleobases de:
 GGTTGACATC GTCTGCCTGT (SEQ ID NO: 208 o SEQ ID NO: 285);
 4. El oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el enlace internucleosídico del oligonucleótido es un enlace fosfodiéster o fosforotioato.
 20 5. El oligonucleótido de la reivindicación 4, en el que el enlace internucleosídico del oligonucleótido es un enlace fosforotioato.
 6. El oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 4-5, en el que el oligonucleótido comprende al menos cinco 2'-desoxinucleósidos contiguos, preferentemente al menos siete 2'-desoxinucleósidos contiguos, de forma más preferida diez 2'-desoxinucleósidos contiguos.
 25 7. El oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en el que el oligonucleótido disminuye la expresión de ARNm de tau o proteína tau mediante la activación de ARNasa H.
 8. El oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que cada C en cualquiera de las secuencias de nucleobases es 5-metilcitosina.
 30 9. El oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la modificación en 2' se selecciona del grupo que consiste en 2'-fluoro, 2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropilo (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetilo (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropilo (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetilaminoetiloxietilo (2'-O-DMAEOE) y 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA).
 35 10. El oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la modificación en 2' es 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE).
 40 11. El oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el oligonucleótido es capaz de disminuir el nivel de expresión de ARNm de tau o proteína tau en al menos el 30% *in vitro*, o al menos el 30% *in vivo*.
 12. Un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en G*G*T*T*G*ACATCGTCTGC*C*T*G*T* (SEQ ID NO: 208) y G*G*T*T*G*A"CAT"CGT"CTG" C*"C*T*G*T* (SEQ ID NO: 285), en el que los nucleótidos con * tienen una modificación 2'-O-MOE; los nucleótidos sin * son 2'-desoxinucleósidos; "C representa 5'-metilcitosina y los enlaces internucleosídicos son fosforotioato.
 45 50 13. Una composición que comprende el oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
 14. El oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 o la composición según la reivindicación 13 para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a tau en un sujeto que lo necesita.
 55 15. El oligonucleótido para su uso según la reivindicación 14, en el que la enfermedad asociada a tau se selecciona del grupo de enfermedad de Alzheimer (EA), esclerosis lateral amiotrófica/complejo de parkinsonismo-demencia (ALS-PDC), demencia argirofílica granulosa (AGD), angiopatía amiloide de tipo británico, angiopatía amiloide cerebral, encefalopatía traumática crónica (CTE), degeneración corticobasal (CBD), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), demencia pugilística, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, síndrome de Down, síndrome de Dravet, epilepsia, demencia frontotemporal (FTD), demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17 (FTDP-17), degeneración lobular frontotemporal, ganglioglioma, gangliocitoma, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, enfermedad de Halervorden-Spatz, enfermedad de Huntington, miositis de cuerpos de inclusión, encefalopatía plúmbica, enfermedad de Lytico-Bodig, meningiogangiomatosis, atrofia multisistémica, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NP-C), enfermedad de neuronas motoras no de Guam con ovillos neurofibrilares, enfermedad de Pick (PiD), parkinsonismo postencefálico, angiopatía amiloide cerebral por proteína priónica, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear

progresiva (PSP), panencefalitis esclerosante subaguda, demencia solo con ovinos, demencia predominante de ovinos, demencia multiinfarto, accidente cerebrovascular isquémico o esclerosis tuberosa.

FIG. 1A



ES 2 984 631 T3

FIG. 1B

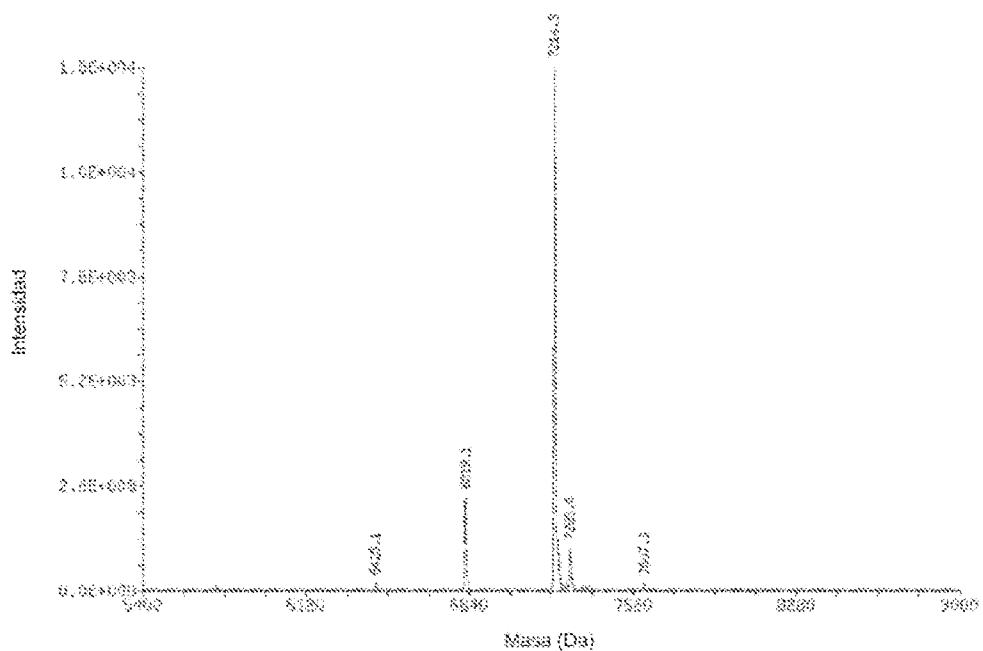


FIG. 1C

Listado de picos de masa clasificados por intensidad							
Masa (Da)	✓ Desv. est	Intensidad	Puntuación	Otrota masa	%Relativo	%Total	Identidad supuesta
7214.3	0.6	1.800+000	68.46	72.0	381.00	48.18	Masa objetivo: 7112.3
6212.3	0.6	1.200+000	68.46	-185.3	37.04	5.00	
7225.3	0.6	1.127+000	68.35	72.4	36.81	4.82	
7223.3	0.6	1.045+000	68.36	68.1	7.84	1.05	
6225.3	0.7	0.615+000	68.31	-187.3	7.87	1.14	
7227.3	0.8	0.495+000	68.30	68.7	1.17	1.47	
7227.3	0.9	0.388+000	68.34	623.3	0.82	1.03	
6423.3	0.8	0.365+000	68.31	-188.3	1.20	0.28	

ES 2 984 631 T3

FIG. 1D

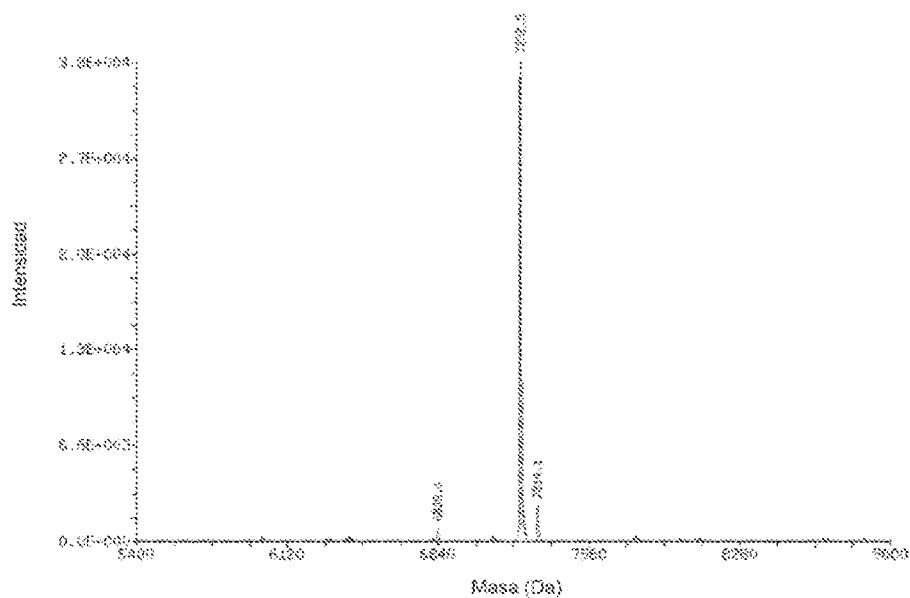


FIG. 1E

Listado de pico de masa clasificados por intensidad							
Masa (Da)	↔ Dens. est.	Intensidad	Puntuación	Delta masa	%Relativo	%Total	Identidad supuesta
7292.5	0.2	3.000+000	38.00	0.0	100.00	38.00	Masa objetivo 7292.5
7293.5	0.2	3.000+000	37.18	16.0	1.00	0.00	
7294.3	0.3	3.000+000	37.08	31.8	8.00	0.00	
6828.3	0.4	2.500+000	37.08	-494.8	1.28	0.00	

FIG. 2A-2E

FIG. 2A Isotomas de prosencéfalo
Transcritos RT-PCR

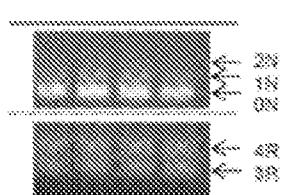


FIG. 2B Isoformas de prosencéfalo
Inmunotransferencia Western
PM (kDa)

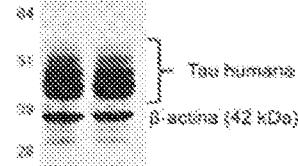


FIG. 2C Distribución de Tau humana
Inmunohistoquímica

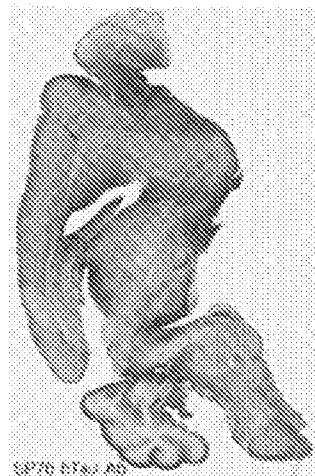


FIG. 2D Silenciamiento de ARNm de tau
4 semanas después del
tratamiento con ASO en la corteza

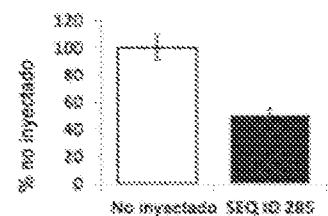


FIG. 2E Silenciamiento de proteína tau
4 semanas después del
tratamiento con ASO en el hipocampo

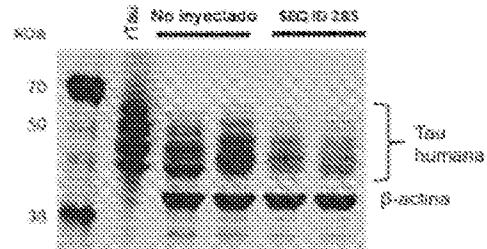


FIG. 3

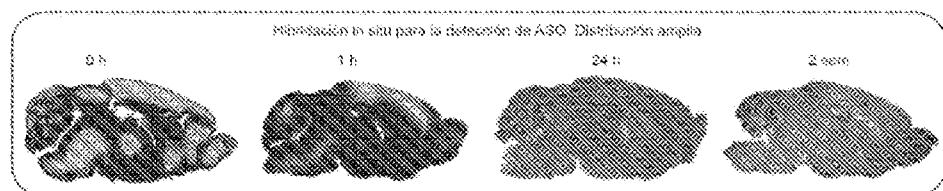


FIG. 4A

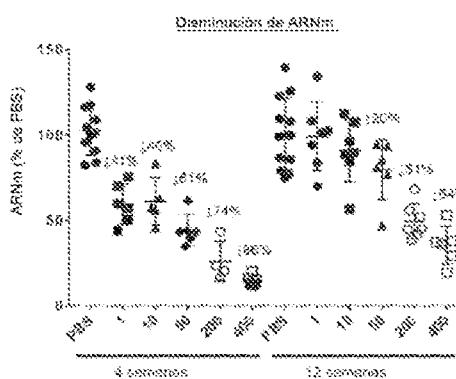


FIG. 4B

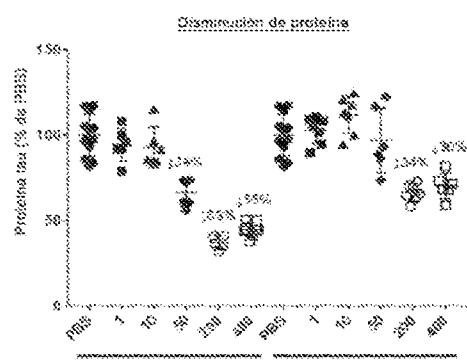


FIG. 5A

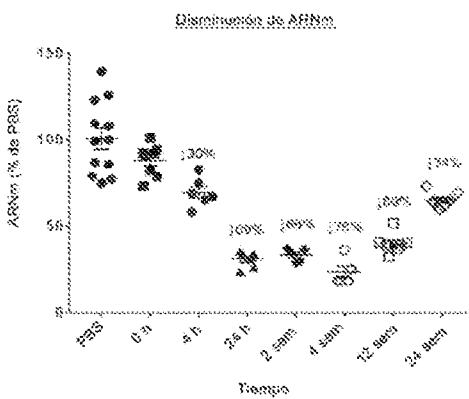


FIG. 5B

