

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036417**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.11.09**

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

(21) Номер заявки  
**201891468**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.12.19**

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ TAU**

---

(31) **62/270,165**

(56) WO-A2-2015010135  
WO-A1-2013148283

(32) **2015.12.21**

(33) **US**

(43) **2018.12.28**

(86) **PCT/IB2016/057794**

(87) **WO 2017/109679 2017.06.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**НОВАРТИС АГ (CH)**

(72) Изобретатель:  
**Полидоро Офенгейм Мануэла, Вайлер  
Ян (US)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

---

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

**036417**

**B1**

**036417**  
**B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

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

### Область техники

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

### Предшествующий уровень техники

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

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

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

### Сущность изобретения

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **Краткое описание чертежей**

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

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

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

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

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

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

### Подробное описание

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

Определения.

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

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

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

Используемый здесь термин "2'-О-метоксиэтил", "2'-МОЕ" или "2'-ОСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>-ОСН<sub>3</sub>" означает О-метоксиэтильную модификацию в 2' положении фуранозного кольца. Модифицированным сахаром является сахар, модифицированный 2'-О-метоксиэтилом. "2'-МОЕ-нуклеозид/нуклеотид" или "2'-О-метоксиэтилнуклеозид/нуклеотид" означает нуклеозид/нуклеотид, содержащий 2'-МОЕ-модифицированную сахарную группу.

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

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

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

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

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

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

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

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

Термин "межнуклеозидная связь" означает химическую связь между нуклеозидами.

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

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

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

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

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

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

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

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

Используемый здесь термин "tau" (также известный как "белок tau, ассоциированный с микротрубочками", MAPT, MSTD; PPND; DDPAC; MAPTL; MTBT1; MTBT2; FTDP-17; PPP1R103) означает белок, ассоциированный с микротрубочками и кодируемый геном MAPT. Человеческий ген MAPT картирован в хромосоме в положении 17q21.1, и геномную последовательность человеческого гена MAPT можно найти в GenBank на сайте NG\_007398.1 (SEQ ID NO: 304). Последовательности интронов и экзонов MAPT и точки ветвления могут быть определены из базы данных геномов Ensembl на web-сайте с использованием программы Transcript: MAPT-203 ENST00000344290. У человека присутствуют восемь изоформ tau, что обусловлено сложным механизмом альтернативного сплайсинга. Используемый здесь термин "tau" является собирательным термином для всех изоформ tau. Последовательности белка и мРНК для самой длинной человеческой изоформы tau представляют собой

ассоциированный с микротрубочками белок tau Homo sapiens (MAPT), вариант транскрипта 6, мРНК (NM\_001123066.3)

```

1 ggacggccga gcggcagggc gctcgcgcgc gcccaactagt ggccggagga
gaaggctccc
61 gcggaggccg cgctgcccgc cccctcccct ggggaggctc gcgttcccgc

```

tgctcgcgcc  
 121 tgcgcccgcc gccggcctca ggaacgcgcc ctcttcgccc gcgcgcgccc  
 tcgcagtcac  
 181 cgccaccac cagctcggc accaacagca gcgccgctgc caccgcccac  
 cttctgcgc  
 241 cgccaccaca gccaccttct cctcctcgc tgcctctcc cgtcctcgc  
 tctgtcgact  
 301 atcaggtgaa ctttgaacca ggatggctga gccccgccag gagttcgaag  
 tgatggaaga  
 361 tcacgctggg acgtacgggt tgggggacag gaaagatcag gggggctaca  
 ccatgcacca  
 421 agaccaagag ggtgacacgg acgctggcct gaaagaatct cccctgcaga  
 cccccactga  
 481 ggacggatct gaggaaccgg gctctgaaac ctctgatgct aagagcactc  
 caacagcggg  
 541 agatgtgaca gcacccttag tggatgaggg agtcccggc aagcaggctg  
 ccgcgagcc  
 601 ccacacggag atcccagaag gaaccacagc tgaagaagca ggcattggag  
 acacccccag  
 661 cctggaagac gaagctgctg gtcacgtgac ccaagagcct gaaagtggta  
 agtggtcca  
 721 ggaaggcttc ctccgagagc cagggcccc aggtctgagc caccagctca  
 tgcccgcat  
 781 gcctggggct cccctcctgc ctgagggccc cagagaggcc acacgccaac  
 cttcggggac  
 841 aggacctgag gacacagagg gcggccgcca cgcccctgag ctgctcaagc  
 accagcttct  
 901 aggagacctg caccaggagg ggccgcccgt gaagggggca gggggcaaag  
 agaggccggg  
 961 gagcaaggag gaggtgatg aagaccgga cgtcgatgag tcctcccc  
 aagactcccc  
 1021 tcctccaag gcctccccag cccaagatgg gcggcctccc cagacagccg  
 ccagagaagc  
 1081 caccagcatc ccaggcttcc cagcggagg tgccatcccc ctccctgtgg  
 atttctctc  
 1141 caaagtttcc acagagatcc cagcctcaga gcccagcggg cccagtgtag

ggcgggccaa  
 1201 agggcaggat gccccctgg agttcacgtt tcacgtggaa atcacacca  
 acgtgcagaa  
 1261 ggagcaggcg cactcggagg agcatttggg aagggctgca tttccagggg  
 cccttgaga  
 1321 ggggccagag gcccggggcc cctctttggg agaggacaca aaagaggctg  
 acctccaga  
 1381 gccctctgaa aagcagcctg ctgctgctcc gcgggggaag cccgtcagcc  
 ggtccctca  
 1441 actcaaagct cgcattgtca gtaaaagcaa agacgggact ggaagcgtg  
 acaaaaaagc  
 1501 caagacatcc acacgttctt ctgctaaaac cttgaaaaat aggccttgcc  
 ttagcccaa  
 1561 acaccccact cctgtagct cagaccctct gatccaacc tccagccctg  
 ctgtgtgccc  
 1621 agagccacct tcctctcta aatacgtctc ttctgtcact tcccgaactg  
 gcagttctgg  
 1681 agcaaaggag atgaaactca agggggctga tggtaaacg aagatcgcca  
 caccgcgggg  
 1741 agcagcccct ccaggccaga agggccaggc caacgccacc aggattccag  
 caaaaacccc  
 1801 gcccgctcca aagacaccac ccagctctgc gactaagcaa gtccagagaa  
 gaccacccc  
 1861 tgcagggccc agatctgaga gaggtgaacc tccaaaatca ggggatcgca  
 gcggctacag  
 1921 cagccccggc tccccaggca ctcccggcag ccgctcccgc accccgtccc  
 ttccaacccc  
 1981 acccaccggg gagccaaga aggtggcagt ggtccgtact ccaccaagt  
 cgccgtcttc  
 2041 cgccaagagc cgctgcaga cagccccgt gccatgcca gacctgaaga  
 atgtcaagtc  
 2101 caagatcggc tccactgaga acctgaagca ccagccggga ggcgggaagg  
 tgagataat  
 2161 taataagaag ctggatctta gcaacgtcca gtccaagtgt ggtcaaagg  
 ataatatcaa  
 2221 acacgtcccg ggaggcggca gtgtgcaaat agtctacaaa ccagttgacc

tgagcaaggt  
2281 gacctccaag tgtggctcat taggcaacat ccatcataaa ccaggaggtg  
gccaggtgga  
2341 agtaaaatct gagaagcttg acttcaagga cagagtccag tcgaagattg  
ggtccctgga  
2401 caatatcacc cacgtccctg gcgaggaaa taaaagatt gaaaccaca  
agctgacctt  
2461 ccgcgagaac gccaaagcca agacagacca cggggcggag atcgtgtaca  
agtcgccagt  
2521 ggtgtctggg gacacgtctc cacggcatct cagcaatgtc tcctccaccg  
gcagcatcga  
2581 catggtagac tcgcccagc tcgccacgct agctgacgag gtgtctgcct  
ccctggccaa  
2641 gcagggtttg tgatcaggcc cctggggcgg tcaataattg tggagaggag  
agaatgagag  
2701 agtgtggaaa aaaaaagaat aatgaccgg ccccgccct ctgccccag  
ctgctcctcg  
2761 cagttcggtt aattggttaa tcacttaacc tgcttttgc actcggcttt  
ggctcgggac  
2821 ttcaaatca gtgatgggag taagagcaaa tttcatcttt ccaaattgat  
gggtgggcta  
2881 gtaataaaat atttaaaaaa aaacattcaa aaacatggcc acatccaaca  
tttctcagg  
2941 caattccttt tgattctttt ttcttcccc tccatgtaga agaggagaa  
ggagaggctc  
3001 tgaaagctgc ttctggggga tttcaaggga ctgggggtgc caaccacctc  
tggccctggt  
3061 gtgggggtgt cacagaggca gtggcagcaa caaaggattt gaaacttgg  
gtgttcgtgg  
3121 agccacaggc agacgatgtc aaccttgtgt gagtgtgacg ggggttggg  
tggggcggga  
3181 ggccacgggg gaggccgagg caggggctgg gcagagggga gaggaagcac  
aagaagtggg  
3241 agtgggagag gaagccacgt gctggagagt agacatcccc ctcttgccg  
ctgggagagc  
3301 caaggcctat gccacctgca gcgtctgagc ggccgcctgt ccttgggtggc

cgggggtggg

3361 ggcctgctgt gggtcagtgt gccaccctct gcagggcagc ctgtgggaga  
agggacagcg

3421 ggtaaaaaga gaaggcaagc tggcaggagg gtggcacttc gtggatgacc  
tccttagaaa

3481 agactgacct tgatgtcttg agagcgctgg cctcttcctc cctccctgca  
gggtaggggg

3541 cctgagttga gggccttccc tctgctccac agaaaccctg ttttattgag  
ttctgaaggt

3601 tggaactgct gccatgattt tggccacttt gcagacctgg gactttaggg  
ctaaccagtt

3661 ctctttgtaa ggacttgctc ctcttgggag acgtccaccg gttccaagc  
ctgggccact

3721 ggcactctctg gactgtgtgg gggctctggga ggcaggctcc gagccccctg  
tccttcccac

3781 ggccactgca gtcaccccgct ctgcccggct gtgctggtgt ctgccgtgag  
agcccaatca

3841 ctgcctatac ccctcatcac acgtcacaat gtcccgaatt cccagcctca  
ccacccttc

3901 tcagtaatga ccctggttgg ttgcaggagg tacctactcc atactgaggg  
tgaaattaag

3961 ggaaggcaaa gtccaggcac aagagtggga ccccagcctc tcaactcag  
ttcactcat

4021 ccaactggga ccctcaccac gaatctcatg atctgattcg gttccctgctc  
tcctcctccc

4081 gtcacagatg tgagccaggg cactgctcag ctgtgaccct aggtgtttct  
gccttggtga

4141 catggagaga gcccttccc ctgagaaggc ctggcccctt cctgtgctga  
gcccacagca

4201 gcaggctggg tgtcttggtt gtcagtgggtg gcaccaggat ggaagggcaa  
ggcaccaggg

4261 gcaggccac agtcccgtg tccccactt gcaccctagc ttgtagctgc  
caacctccca

4321 gacagcccag cccgctgctc agctccacat gcatagtatc agccctccac  
acccgacaaa

4381 ggggaacaca cccccttggga aatggttctt ttccccagc cccagctgga

agccatgctg  
4441 tctgttctgc tggagcagct gaacatatac atagatgttg ccctgcctc  
cccatctgca  
4501 ccctgttgag ttgtagttgg atttgtctgt ttatgcttgg attcaccaga  
gtgactatga  
4561 tagtgaaaag aaaaaaaaaa aaaaaaaagg acgcatgtat cttgaaatgc  
ttgtaaagag  
4621 gtttctaacc caccctcacg aggtgtctct cacccccaca ctgggactcg  
tgtggcctgt  
4681 gtggtgccac cctgctgggg cctcccaagt tttgaaaggc tttcctcagc  
acctgggacc  
4741 caacagagac cagcttctag cagctaagga ggccgttcag ctgtgacgaa  
ggcctgaagc  
4801 acaggattag gactgaagcg atgatgtccc cttccctact tccccttggg  
gctccctgtg  
4861 tcagggcaca gactaggtct tgtggctggg ctggccttgcg gcgcgaggat  
ggttctctct  
4921 ggtcatagcc cgaagtctca tggcagtccc aaaggaggct tacaactcct  
gcatcacaag  
4981 aaaaaggaag ccaactgccag ctggggggat ctgcagctcc cagaagctcc  
gtgagcctca  
5041 gccaccctc agactgggtt cctctccaag ctgcacctct ggaggggcag  
cgcagcctcc  
5101 caccaagggc cctgcgacca cagcaggat tgggatgaat tgctgtcct  
ggatctgctc  
5161 tagaggccca agctgcctgc ctgaggaagg atgacttgac aagtcaggag  
aactgttcc  
5221 caaagccttg accagagcac ctgagcccgc tgaccttgca caaactccat  
ctgctgcat  
5281 gagaaaaggg aagccgcctt tgcaaaacat tgctgcctaa agaaactcag  
cagcctcagg  
5341 cccaattctg ccacttctgg tttgggtaca gttaaaggca accctgaggg  
acttggcagt  
5401 agaaatccag gcctcccct ggggctggca gcttcgtgtg cagctagagc  
tttacctgaa  
5461 aggaagtctc tgggccaga actctccacc aagagcctcc ctgccgttcg

ctgagtccca  
 5521 gcaattctcc taagttgaag ggatctgaga aggagaagga aatgtggggg  
 agatttgggtg  
 5581 gtggtttagag atatgcccc ctcattactg ccaacagttt cggctgcatt  
 tcttcacgca  
 5641 cctcggttcc tcttcctgaa gttcttgtgc cctgctcttc agcaccatgg  
 gccttcttat  
 5701 acggaaggct ctgggatctc ccccttgtgg ggcaggctct tggggccagc  
 ctaagatcat  
 5761 ggtttagggg gatcagtgtc ggcagataaa ttgaaaaggc acgctggcct  
 gtgatcttaa  
 5821 atgaggacaa tccccccagg gctgggcact cctcccctcc cctcacttct  
 cccacctgca  
 5881 gagccagtgt ccttgggtgg gctagatagg atatactgta tgccggctcc  
 ttcaagctgc  
 5941 tgactcactt tatcaatagt tccatttaaa ttgacttcag tggtgagact  
 gtatcctggt  
 6001 tgctattgct tgttgtgcta tggggggagg ggggaggaat gtgtaagata  
 gttaacatgg  
 6061 gcaaagggag atcttggggg gcagcactta aactgcctcg taaccctttt  
 catgatttca  
 6121 accacatttg ctagagggag ggagcagcca cggagttaga ggccttggg  
 gtttctcttt  
 6181 tccactgaca ggctttccca ggcagctggc tagttcattc cctccccagc  
 caggtgcagg  
 6241 cgtaggaata tggacatctg gttgctttgg cctgctgccc tctttcaggg  
 gtcctaagcc  
 6301 cacaatcatg cctccctaag accttggcat ccttccctct aagccgttgg  
 cacctctgtg  
 6361 ccacctctca cactggctcc agacacacag cctgtgcttt tggagctgag  
 atcactcgct  
 6421 tcaccctcct catctttggt ctccaagtaa agccacgagg tcggggcgag  
 ggcagaggtg  
 6481 atcacctgcg tgtccatct acagacctgc agcttcataa aacttctgat  
 ttctcttcag  
 6541 ctttgaaaag ggttaccctg ggcactggcc tagagcctca cctcctaata  
 gacttagccc  
 6601 catgagtttg ccatgttgag caggactatt tctggcactt gcaagtccca  
 tgatttcttc  
 6661 ggtaattctg aggggtgggg gagggacatg aatcatctt agcttagctt  
 tctgtctgtg  
 6721 aatgtctata tagtgtattg tgtgttttaa caaatgattt aactgactg  
 ttgctgtaaa  
 6781 agtgaatttg gaaataaagt tattactctg attaaa (SEQ ID NO:  
 305)

## Ассоциированный с микротрубочками белок tau Homo sapiens, изоформа 6 (NP\_001116538.2)

MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT
PTEDGSEEPG	SETSDAKSTP	TAEDVTAPLV	DEGAPGKQAA	AQPHTEIP EG
TTAEEAGIGD	TPSLEDEAAG	HVTQEPESGK	VVQEGFLREP	GPPGLSHQLM
SGMPGAPLLP	EGPREATRQP	SGTGPEDTEG	GRHAPELLKH	QLLGDHLQEG
PPLKGAGGKE	RPGSKEEVDE	DRDVDESSPQ	DSPPSKASPA	QDGRPPQTAA
REATSIPGFP	AEGAIPLPVD	FLSKVSTEIP	ASEPDGPSVG	RAKGQDAPLE
FTFHVEITPN	VQKEQAHSEE	HLGRAAFPGA	PGEGPEARGP	SLGEDTKEAD
LPEPSEKQPA	AAPRGKPVSR	VPQLKARMVS	KSKDGTGSDD	KKAKTSTRSS
AKTLKNRPCL	SPKHPTPGSS	DPLIQSSSPA	VCPEPPSSPK	YVSSVTSRTG
SSGAKEMKLN	GADGKTKIAT	PRGAAPPQK	GQANATRIPA	KTPPAPKTPP
SSATKQVQRR	PPPAGPRSER	GEPPKSGDRS	GYSSPGSPGT	PGSRSRTPSL
PTPPTREPCK	VAVVRTPPKS	PSSAKSRLQT	APVPMPLKN	VKSKIGSTEN
LKHQPGGGKV	QIINKKLDLS	NVQSKCGSKD	NIKHVPGGGS	VQIVYKPVDL
SKVTSKCGSL	GNIHNKPGGG	QVEVKSEKLD	FKDRVQSKIG	SLDNITHVPG
GGNKKIETHK	LTFRENAKAK	TDHGAEIVYK	SPVVSQDTSP	RHLSNVSSGT

SIDMVDSPLQ ATLADSVSAS LAKQGL (SEQ ID NO: 306)

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

- изоформа tau 1: NM\_016835.4 (мРНК)® NP\_058519.3 (белок);
- изоформа tau 2: NM\_005910.5 (мРНК)® NP\_005901.2 (белок);
- изоформа tau 3: NM\_016834.4 (мРНК)® NP\_058518.1 (белок);
- изоформа tau 4: NM\_016841.4 (мРНК)® NP\_058525.1 (белок);
- изоформа tau 5: NM\_001123067.3 (мРНК)® NP\_001116539.1 (белок);
- изоформа tau 7: NM\_001203251.1 (мРНК)® NP\_001190180.1 (белок);
- изоформа tau 8: NM\_001203252.1 (мРНК)® NP\_001190181.1 (белок).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Антисмысловые олигонуклеотиды.

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

антисмыслового олигонуклеотида и нуклеиновой кислоты-мишени при условии, что антисмысловый олигонуклеотид будет сохранять способность специфически гибридизоваться с нуклеиновой кислотой-мишенью.

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

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

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

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

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

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

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

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

Химическая модификация антисмысловых олигонуклеотидов.

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

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

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

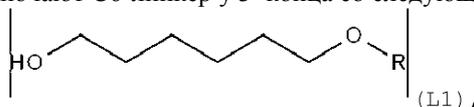
представляет собой фосфориатную межнуклеозидную связь.

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

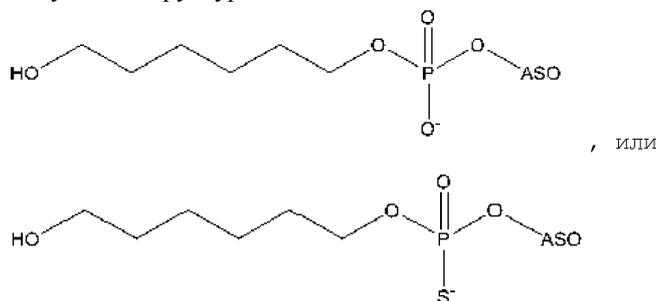
В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмысловые олигонуклеотиды могут включать замену нуклеотида в заданном положении модифицированным вариантом того же самого нуклеотида. Так, например, нуклеотид (A, G, C или T) может быть заменен соответствующим гипоксантином, ксантином,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

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

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



которая присоединена к 3'-концу олигонуклеотида посредством фосфатного мостика, где R=PO<sub>2</sub>-О-олигонуклеотид (для фосфодиэфирных межнуклеозидных связей) или R=POS-О-олигонуклеотид (для фосфориатных межнуклеозидных связей). Такой 3'-С6-линкер может блокировать 3'-экзонуклеазную атаку и, следовательно, повышать стабильность и длительность действия антисмысловых олигонуклеотидов (см. WO 2005/021749 для аналогичной стратегии применительно к кРНК). В некоторых случаях 3'-С6-линкер может также облегчать синтез и/или очистку антисмысловых олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, могут иметь любую из следующих структур:



В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанные здесь антисмысловые олигонуклеотиды могут включать альтернативный остов, например морфолино, блокированную нуклеиновую кислоту (LNA), неблокированную нуклеиновую кислоту (UNA), трезосодержащую нуклеиновую кислоту (TNA), гликольсодержащую нуклеиновую кислоту (GNA) и/или пептидсодержащую нуклеиновую кислоту (PNA). В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмысловые олигонуклеотиды могут включать бициклический нуклеозид (BNA), содержащий мостик, соединяющий два атома углерода сахарного кольца. Так, например, такой BNA может включать "стерически затрудненный этил" (или "сEt"), содержащий 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2'-мостик, соединяющий 4'-углерод и 2'-углерод сахарной

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

#### Стерические блокаторы.

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

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

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

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

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

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

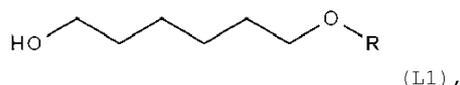
введение 2'-модификации сахарного кольца (такой как 2'-О-метоксиэтил, МОЕ), включение блокированной нуклеиновой кислоты (LNA) и/или модификации остова (такого как фосфортиоатный остов) может снижать расщепление нуклеазой и/или повышать аффинность связывания антисмысловых олигонуклеотидов. Стерические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

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

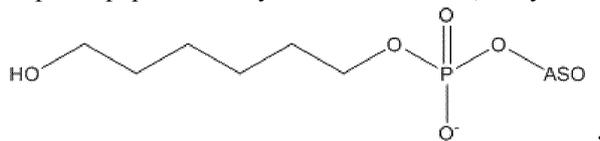
В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на MART, представляют собой стерические блокаторы, которые имеют межнуклеозидные фосфодиэфирные или фосфортиоатные связи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на MART, представляют собой стерические блокаторы, которые содержат модификации остова, препятствующие связыванию с РНКазой Н. Такие стерические блокаторы могут включать модифицированные межнуклеозидные связи, например метилфосфонатную связь, метилфосфониоатную связь, фосформорфолидатную связь, фосфорпиперазидатную связь или фосфорамидитную связь. В некоторых вариантах осуществления каждая другая межнуклеозидная связь может содержать модифицированный фосфат с 2'-низшей алкильной группой (такой как, например, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, прямой или разветвленный насыщенный или ненасыщенный алкил, такой как метил, этил, этенил, пропил, 1-пропенил, 2-пропенил и изопропил) или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на MART, представляют собой стерические блокаторы, которые включают одну или более модифицированных межнуклеозидных связей, описанных в патенте США № 5149797.

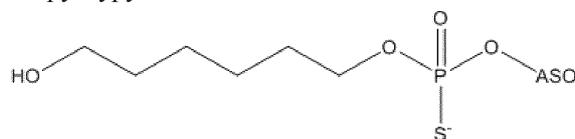
В некоторых вариантах осуществления описанные здесь стерические блокаторы, нацеленные на MART, включают С6-линкер у 3'-конца со следующей структурой:



которая присоединена к 3'-концу олигонуклеотида посредством фосфатного мостика, где R=PO<sub>2</sub>-О-олигонуклеотид (для фосфодиэфирных межнуклеозидных связей) или R=POS-О-олигонуклеотид (для фосфортиоатных межнуклеозидных связей). В соответствии с этим стерические блокаторы, нацеленные на MART и включающие фосфодиэфирные межнуклеозидные связи, могут иметь следующую структуру:



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



#### Гапмеры.

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления изобретения центральный гэтап-сегмент гапмера состоит по меньшей мере из пяти (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) смежных 2'-дезоксирибонуклеотидов, а сегменты 5'- и 3'-крыльев содержат один или более 2'-модифицированных нуклеотидов. Сообщалось, что химерный олигонуклеотид, содержащий фрагмент от одного до четырех смежных 2'-дезоксирибонуклеотидов, не активирует РНКазу H. См. патент США № 9157081. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, представляют собой гапмеры, содержащие по меньшей мере семь (например, 7, 8, 9, 10, 11, 12) смежных 2'-дезоксирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на МАРТ, представляют собой гапмеры, содержащие десять смежных 2'-дезоксирибонуклеотидов. 2'-Модификация может быть выбрана из группы, состоящей из 2'-фтора, 2'-дезоксидифтора, 2'-О-метила, 2'-О-метоксиэтила (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропила (2'-О-АП), 2'-О-диметиламиноэтила (2'-О-ДМАОЕ), 2'-О-диметиламинопропила (2'-О-ДМАР), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-О-ДМАЕОЕ) и 2'-О-N-метилацетида (2'-О-NМА).

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

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

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

Геномные последовательности МАРТ, на которые нацелены антисмысловые олигонуклеотиды.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловые олигонуклеотиды были сконструированы так, чтобы они были нацелены на конкретную область геномной последовательности МАРТ (GenBank, пер. № NG\_007398.1 (SEQ ID NO: 304) или область соответствующей мРНК или транскрипта tau (SEQ ID NO: 306). Последовательности интронов и экзонов МАРТ и точки ветвления были определены исходя из базы данных геномов Ensembl на web-сайте с использованием программы Transcript: МАРТ-203 ENST00000344290. Скрининг экзонов, интронов и стыков интрон/экзон человеческого гена МАРТ показал, что нацеливание на некоторые области в гене или транскрипте МАРТ с помощью антисмысловых олигонуклеотидов является более эффективным для снижения уровня экспрессии tau, чем нацеливание на другие области. Так, например, в табл. 1 перечислены последовательности некоторых предпочтительных областей в гене или транскрипте МАРТ, которые могут быть мишенями для антисмысловых олигонуклеотидов.

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

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

Таблица 1

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

Выбранные геномные последовательности МАРТ (антисмысловая цепь), на которые нацелены ASO tau	SEQ ID NO	Локализация	Соответствующая последовательность мРНК или пре-мРНК МАРТ, на которую нацелены ASO tau
ACGCTGGCCTGAAAGGTTAGTGGAC	292	Стык интрон/экзон 1	GUCCACUAACCUUUCAGGCCAGCGU (SEQ ID NO: 503)
AAAAGCCAAGGTAAGCTGACGATGC	293	Стык интрон/экзон 5	GCAUCGUCAGCUUACCUUGGCUUUU (SEQ ID NO: 504)
TTTTATATTTATCAGCTCGCATGG	294	Стык интрон/экзон 5	CCAUGCGAGCGAUAAAAUAUAAAA (SEQ ID NO: 505)
ACCCACAAGCTGACCTTCCG	295	Экзон 13	CGGAAGGUCAGCUUGUGGGU (SEQ ID NO: 487)
ACCAGCTGAAGAAGCAGGCATTGGAGACAC	296	Экзон 4	GUGUCUCCAAUGCCUGCUUCUUCAGCUGU (SEQ ID NO: 488)
CTCTCATCTCCAGGTGCAAATAGTC	297	Стык интрон/экзон 11	GACUAAUUGCACCUGGAGAGAGAG (SEQ ID NO: 506)
ATAGTCTACAAACCAGTTGA	298	Экзон 11	UCAACUGGUUUUGUAGACUAAU (SEQ ID NO: 489)
ATTAGGCAACATCCATCATA	299	Экзон 11	UAUGAUGGAUGUUGCCUAAU (SEQ ID NO: 490)
GAACCAGGATGGCTGAGCCC	300	Экзон 1	GGGCUCAGCCAUCUGGUUC (SEQ ID NO: 491)
CGTCCCTGGCGGAGGAAA	301	Экзон 12	UUUCCUCCGCCAGGGACG (SEQ ID NO: 492)
TGGTCAGTAAAAGCAAAGAC	302	Экзон 5	GUCUUUGCUUUUACUGACCA (SEQ ID NO: 493)
CTGGAAGCGATGACAAAAA	303	Экзон 5	UUUUUGUCAUCGCUUCCAG (SEQ ID NO: 494)
CCTTGCTCAGGTCAACTGGT	479	Экзон 12	ACCAGUUGACCUGAGCAAGG (SEQ ID NO: 495)
GGTGACATCGTCTGCCTGT	480	3'UTR	ACAGGCAGACGAUGUCAACC (SEQ ID NO: 496)
GTCCCACTCTTGTGCCTGGA	481	3'UTR	UCCAGGCACAAGAGUGGGAC (SEQ ID NO: 497)
GACATCGTCTGCCTGTGGCT	482	3'UTR	AGCCACAGGCAGACGAUGUC (SEQ ID NO: 498)
CCCACTCTTGTGCCTGGA	483	3'UTR	AGUCCAGGCACAAGAGUGGG (SEQ ID NO: 499)
GTCCAGGTCTGCAAAGTGG	484	3'UTR	CCACUUUGCAGACCUUGGGAC (SEQ ID NO: 500)
GTCTGCCTGTGGCTCCACGA	485	3'UTR	UCGUGGAGCCACAGGCAGAC (SEQ ID NO: 501)
AGTCACTCTGGTGAATCCAA	486	3'UTR	UUGGAUUCACCAGAGUGACU (SEQ ID NO: 502)

Конъюгаты антисмысловых олигонуклеотидов.

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

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

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь антисмысловые олигонуклеотиды связаны с жирной кислотой, например с жирной кислотой омега-3 или с жирной кислотой омега-6. Подходящими жирными кислотами омега-3 являются, например,  $\alpha$ -линоленовая кислота (ALA), докозагексаеновая кислота (DHA), эйкозапентаеновая кислота (EPA), докозапентаеновая кислота (DPA), эйкозатетраеновая кислота (ETA), эйкозатриеновая кислота (ETE), эйкозапентаеновая кислота (EPA), гексатриеновая кислота (HTA), геникозапентаеновая кислота (HPA), стеарионовая кислота (SDA), тетракозапентаеновая кислота и тетракозагексаеновая кислота.

Тестирование активности антисмысловых олигонуклеотидов.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Синтез и характеристика олигонуклеотидов.

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

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

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

Терапевтическое применение и способы лечения.

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

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

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

Комбинированная терапия.

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

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

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

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

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

Приготовление образцов.

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

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

Фармацевтические композиции, дозы и введение.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Данные, полученные в анализах на клеточных культурах и в исследованиях на животных, могут быть использованы при определении интервала доз для их введения человеку. Доза таких соединений составляет предпочтительно в пределах диапазона циркулирующих концентраций, которые включают ED<sub>50</sub> с небольшой токсичностью или с отсутствием токсичности. Доза может варьироваться в пределах этого интервала в зависимости от используемой лекарственной формы и способа введения. Для любого соединения, используемого в способе согласно изобретению, терапевтически эффективная доза может быть предварительно вычислена с помощью анализов на клеточных культурах. Эта доза может быть приготовлена для введения животным-моделям в целях достижения диапазона циркулирующих концентраций в плазме, которые включают IC<sub>50</sub> (т.е. концентрацию тестируемого соединения, при которой достигается полумаксимальное ингибирование симптомов), как было определено в клеточной культуре. Такая информация может быть использована в целях более точного определения доз для введения человеку. Уровни в плазме могут быть измерены, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный здесь антисмысловый олигонуклео-

тид растворяют в стерильной воде, физиологическом растворе (например, забуференном фосфатом физиологическом растворе) или цереброспинальной жидкости (CSF) для введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный здесь антисмысловый олигонуклеотид вводят интратекально, например, посредством болюсной инъекции в межпозвонокковое пространство L3 или L4 или путем инфузии с помощью интратекального насоса.

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

#### Наборы.

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

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

#### Примеры

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

#### Пример 1. Общие материалы и методы.

Синтез и очистка антисмысловых олигонуклеотидов.

Описанные здесь модифицированные антисмысловые олигонуклеотиды были получены с использованием стандартной фосфорамидитной химии на синтезаторе Mermaid192 (BioAutomation) для использования *in vitro* и на Mermaid 12 (Bio Automation) для использования *in vivo*. Фосфорамидиты растворяли в ацетонитриле при концентрации 0,15M (0,08M на Mermaid192), а связывание проводили путем активации фосфорамидитов 0,5M раствором 5-этилтиотетразола в ацетонитриле (0,25M на Mermaid192). Время связывания обычно составляло 3-4 мин. Сульфирование осуществляли с использованием 0,2M раствора фенилацетилдисульфида в течение 5 мин. Окисление осуществляли с использованием 0,02M раствора йода в пиридине (20%)/воде (9,5%)/тетрагидрофуране (70,5%) в течение 2 мин. Кэпирование осуществляли с использованием стандартных кэпирующих реагентов. Растущие олигонуклеотидные цепи были подвергнуты детритилированию для последующего связывания с 3% дихлоруксусной кислотой в толуоле. После получения последовательностей соединения, связанные с носителем, расщепляли и подвергали реакции снятия защиты с использованием жидкого гидроксида аммония при 65°C в течение 2 ч. Полученные неочищенные растворы непосредственно очищали с помощью ВЭЖХ (Akta Explorer). Очищенные фракции анализировали с помощью масс-спектрометрии и количественно оценивали путем УФ-облучения с коэффициентом экстинкции на 260 нм. Собранные фракции обессоливали и лиофилизовали досуха.

*In vitro* тестирование антисмысловых олигонуклеотидов.

Антисмысловые олигонуклеотиды тестировали *in vitro* в различных клеточных линиях, включая, но не ограничиваясь ими, человеческие клеточные линии, такие как клетки Nuh7, клетки Hela и клетки SH-SY5Y, и клеточные линии зеленой мартышки COS1.

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

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

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

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

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

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

Анализ на экспрессию генов TaqMan были проведены с помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени в соответствии с протоколом, описанным в наборе для проведения мультиплексной ОТ-ПЦР QuantiTect (Qiagen Cat # 204643) с использованием дуплексной реакции ОТ-ПЦР. Были использованы зонды TaqMan, специфичные к человеческому MAPT (LifeTech AssayID # Hs00902194\_m1: FAM-MGB), человеческому GAPDH (LifeTech AssayID # Hs02758991\_g1: VIC-MGB), человеческому TBP (LifeTech Cat # 4326322E) или человеческому HPRT1 (LifeTech Cat # 4333768T). Образцы были подвергнуты ПЦР-реакции в реальном времени на системе ViiA7 (Life Technologies) в соответствии с рекомендованными условиями проведения циклов дуплексной ОТ-ПЦР. Все данные были скорректированы по количеству исходной кДНК, а уровни мРНК tau нормализованы по уровням эндогенного эталонного гена. Ген tau и контрольный ген амплифицировали в одной и той же реакции ПЦР с аналогичной высокой эффективностью, что позволяло проводить относительную количественную оценку методом ААСТ. Результаты были представлены как процент остаточной мРНК tau по отношению к контрольным клеткам, обработанным PBS.

Тестирование *in vivo* антисмысловых олигонуклеотидов.

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

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

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

Пример 2. Ингибирование экспрессии человеческого Тау в клетках Nuh7 посредством 18-мерных стерических блокаторов 2'-О-МОЕ.

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

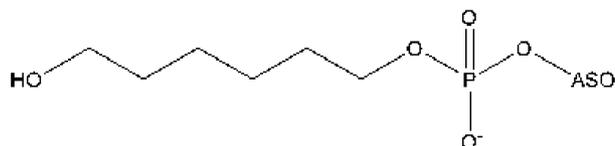
18-Мерные 2'-О-МОЕ-стерические блокаторы, нацеленные на тау, тестировали *in vitro* на их активность в ингибировании мРНК человеческого тау. Клетки Nuh7 высевали при плотности 10000 клеток на лунку и трансфицировали реагентом OptiFect (Lifetech Cat# 12579-017) под действием 25 нМ антисмыслового олигонуклеотида. После обработки в течение 48 ч кДНК непосредственно выделяли из культивируемых клеток с использованием мультиплексного набора для клеток Fastlane (Qiagen Cat # 216513). Уровни мРНК тау измеряли с помощью количественной ПЦР в реальном времени в дуплексной ОТ-ПЦР с использованием зондов TaqMan, специфичных к человеческому МАРТ (LifeTech AssayID # Hs00902194\_m1: FAM-MGB) и человеческому ТВР (белку, связывающемуся с ТАТА-боксом), используемому в качестве эндогенного контроля (LifeTech Cat # 4326322E). Все данные были скорректированы по количеству исходной кДНК, а уровни мРНК тау нормализовали по уровням эндогенного эталонного гена ТВР. Ген тау и контрольный ген ТВР амплифицировали в одной и той же реакции ПЦР с аналогичной высокой эффективностью, что позволяло проводить относительную количественную оценку методом ΔΔСТ. Результаты были представлены как процент остаточной мРНК тау по отношению к контрольным клеткам, обработанным PBS. В табл. 2 проиллюстрированы активности этих 18-мерных 2'-О-МОЕ-стерических блокаторов в клетках Nuh7.

Ингибирование мРНК tau 18-мерными 2'-О-МОЕ-стерическими блокаторами в клетках Nuh7

SEQ ID NO	Последовательность ASO <sup>1</sup>	% Остаточной мРНК <sup>2</sup>
1	GTCCACTAACCTTTCAGG	19,5
2	GCATCGTCAGCTTACCTT	27,7
3	TATTTGCACCTGGAGATG	38,4
4	GACTATTTGCACCTGGAG	40,8
5	CATGCGAGCTGATAAAAT	40,9
6	ACCATGCGAGCTGATAAA	41,3
7	CCATGCGAGCTGATAAAA	43,3
8	CGTCAGCTTACCTTGGCT	44,1
9	TGACCATGCGAGCTGATA	47,4
10	ATGCGAGCTGATAAAATA	52,1
11	TTTGACCTGGAGATGAG	52,3
12	TTGCACCTGGAGATGAGA	52,4
13	ATTTGCACCTGGAGATGA	61,9
14	TCCACTAACCTTTCAGGC	68,2
15	GGTTCAATCTGCAAGAA	68,8
16	CCACTAACCTTTCAGGCC	71,3
17	CACTAACCTTTCAGGCCA	72,9
18	ACTAACCTTTCAGGCCAG	76,7
19	GCTCAGCCATCCTGGTTC	77,3
20	GTTTCAATCTGCAAGAAG	80,4
21	AGTTCACCTGGGAAAGA	85,8
22	TTGGAGGTTACCTGGGA	85,9
23	GGCTACCTGGTTTATGAT	88,8
24	AAAGTTCACCTGGGAAA	92,1
25	GTTCACTGACCTTGGGTC	96,8
26	CAAAGTTCACCTGGGAA	98,4
27	CAGCTTACCTTGGCTTTT	99,8
28	GGGCTACCTGGTTTATGA	101,6
29	TCTTCAGCTGGTGTATGT	103,4
30	TTCAAAGTTCACCTGGGG	103,4
31	CCCTTACCTTTTTATTT	104,7
32	TGCTTCTTCAGCTGGTGT	106,1
33	TCAGCTTACCTTGGCTTT	106,7
34	CTGCTTCTTCAGCTGGTG	107,9
35	GGCCACCTCCTAGAACAC	108,4
36	TCTTACCAGAGCTGGGTG	108,8
37	AAGTTCACCTGGGAAAG	109,4
38	GTCAGCTTACCTTGGCTT	109,5
39	GGGGCCTGATCACAAACC	109,7
40	AGGTTCACCTGGGAAGGA	110,2
41	GCTTACCTTGGCTTTTTT	111,4
42	TCAAAGTTCACCTGGGGA	111,7
43	CCACTCTCACCTTCCCGC	112,8
44	CCCCCTTACCTTTTTAT	113
45	GAGGTTCACCTGGGAAGG	113,3
46	GTTACCTGGGAAGGAAG	113,6
47	CACCTCCTAGAACACAAC	114,1
48	ACTCTCACCTTCCCCT	114,5
49	TTCAATCTGCAAGAAGAG	114,6
50	ACTGACCTTGGGTCACGT	114,7
51	TTTCAATCTGCAAGAAGA	115,1
52	TTCTTACCAGAGCTGGGT	115,5
53	CAGGGCTACCTGGTTTAT	116,1
54	GGGCCTGATCACAAACCC	116,5
55	AGGGCTACCTGGTTTATG	117,2

56	CCACCTCCTAGAACACAA	117,6
57	CACTGACCTTGGGTCACG	118,4
58	CCCCTTTACSTTTTATT	118,4
59	TTCACCTGACCTTGGGTCA	118,6
60	GGCCTGATCACAACCCCT	119,6
61	CACTCTCACCTTCCC GCC	119,7
62	CCTGGCCACCTCCTAGAA	120,4
63	CCTTTACSTTTTATTTC	120,6
64	TCACTGACCTTGGGTCAC	121,7
65	GCCTGATCACAACCCCTG	122
66	CTTTACSTTTTATTTC	122,5
67	TTCTTCAGCTGGTGTATG	124
68	GCCACCTCCTAGAACACA	126,5
69	TCTCACCTTCCC GCCTCC	127,4
70	CTTCTTACCAGAGCTGGG	129,8
71	TTCTTCTTACCAGAGCTG	131,2
72	ATCAGCCCCCTGTAATG	131,3
73	GCTTCTTCAGCTGGTGTA	133,9
74	ACAGGGCTACCTGGTTTA	134,3
75	CTCAGCCATCCTGGTTCA	134,4
76	CAGCCCCCTGTAATGAA	136,4
77	GGGCTCAGCCATCCTGGT	137,9
78	TCTTCTTACCAGAGCTGG	139
79	CTCTCACCTTCCC GCCTC	143,1
80	TCAGCCCCCTGTAATGA	145,9
81	CTTCTTCAGCTGGTGTAT	148
82	GGTTCACCTGGGAAGGAA	153,5
83	CATCAGCCCCCTGTAAT	156,4
84	ACCATCAGCCCCCTGTAA	157,5

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



2. % Остаточной мРНК означает уровень мРНК tau в клетках Nuh7, обработанных одной дозой 25 нМ ASO tau в течение 48 ч, по сравнению с уровнем мРНК tau в контрольных клетках Nuh7, обработанных PBS. Так, например, 19,5% остаточная мРНК означает ASO SEQ ID NO: 1, обладающая 80,5% активностью в снижении уровня мРНК tau.

Пример 3. Ингибирование экспрессии человеческого Тау в клетках SH-SY5Y под действием 18-мерных 2'-О-МОЕ-стерических блокаторов.

Стерические блокаторы, которые значительно снижают уровень экспрессии тау, как описано в примере 2, были отобраны и протестированы в человеческих клетках нейробластомы SH-SY5Y. Культивируемые клетки SH-SY5Y подвергали нуклеофекции под действием 1000 нМ выбранного антисмыслового олигонуклеотида. После обработки в течение приблизительно 24 ч кДНК непосредственно выделяли из культивированных клеток с использованием мультиплексного набора для клеток Fastlane (Qiagen Cat # 216513). Уровни мРНК tau измеряли с помощью количественной ПЦР в реальном времени с использованием дуплексной ОТ-ПЦР. Были использованы зонды Taqman, специфичные к человеческому MAPT (Lifetech AssayID # Hs00902194\_m1: FAM-MGB) и человеческому GAPDH (LifeTech AssayID # Hs02758991\_g1: VIC-MGB). Все данные были скорректированы по количеству исходной кДНК, а уровни мРНК tau нормализованы по уровням эндогенного эталонного гена GAPDH. Ген tau и контрольный ген GAPDH амплифицировали в одной и той же реакции ПЦР с аналогичной высокой эффективностью, что позволяло проводить относительную количественную оценку методом  $\Delta\Delta CT$ . Результаты были представлены как процент остаточной мРНК tau по отношению к контрольным клеткам, обработанным PBS. В табл. 3 проиллюстрированы активности отобранных 18-мерных 2'-О-МОЕ-стерических блокаторов в клетках SH-SY5Y.

Таблица 3

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

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

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

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

Таблица 4

IC<sub>50</sub> отобранных 18-мерных 2'-О-МОЕ-стерических блокаторов

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

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

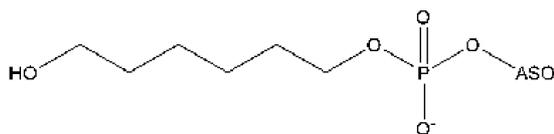
Стерические блокаторы, которые значительно снижали уровень экспрессии tau, как описано в примерах 2 и 3, были отобраны и получены так, чтобы их длина варьировалась от 12 до 25 нуклеозидов. Эти 12-25-мерные 2'-О-МОЕ-стерические блокаторы были протестированы в клетках SH-SY5Y. Культивируемые клетки SH-SY5Y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

Ингибирование мРНК Тау в клетках SH-SY5Y под действием 12-25-мерных  
2'-О-МОЕ-стерических блокаторов

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

121	GA <sup>13</sup> CTATTTG <sup>13</sup> CA <sup>13</sup> C <sup>13</sup> CTGGA	38,4	17	11
122	GA <sup>13</sup> CTATTTG <sup>13</sup> CA <sup>13</sup> C <sup>13</sup> CTGG	41,2	16	11
123	GA <sup>13</sup> CTATTTG <sup>13</sup> CA <sup>13</sup> C <sup>13</sup> CTG	45,6	15	11
124	GA <sup>13</sup> CTATTTG <sup>13</sup> CA <sup>13</sup> C <sup>13</sup> CT	46,8	14	11
125	GA <sup>13</sup> CTATTTG <sup>13</sup> CA <sup>13</sup> C <sup>13</sup> C	47,5	13	11
126	GA <sup>13</sup> CTATTTG <sup>13</sup> CA <sup>13</sup> C	56,2	12	11
127	<sup>13</sup> C <sup>13</sup> CATG <sup>13</sup> CGAG <sup>13</sup> CTGATAAAAATATAAAA	20,0	25	5
128	<sup>13</sup> C <sup>13</sup> CATG <sup>13</sup> CGAG <sup>13</sup> CTGATAAAAATATAAA	14,7	24	5
129	<sup>13</sup> C <sup>13</sup> CATG <sup>13</sup> CGAG <sup>13</sup> CTGATAAAAATATAA	24,9	23	5
130	<sup>13</sup> C <sup>13</sup> CATG <sup>13</sup> CGAG <sup>13</sup> CTGATAAAAATATA	20,3	22	5
131	<sup>13</sup> C <sup>13</sup> CATG <sup>13</sup> CGAG <sup>13</sup> CTGATAAAAATAT	24,3	21	5
132	<sup>13</sup> C <sup>13</sup> CATG <sup>13</sup> CGAG <sup>13</sup> CTGATAAAAATA	27,2	20	5
133	<sup>13</sup> C <sup>13</sup> CATG <sup>13</sup> CGAG <sup>13</sup> CTGATAAAAAT	23,7	19	5
134	<sup>13</sup> C <sup>13</sup> CATG <sup>13</sup> CGAG <sup>13</sup> CTGATAAAA	24,0	18	5
135	<sup>13</sup> C <sup>13</sup> CATG <sup>13</sup> CGAG <sup>13</sup> CTGATAAA	19,8	17	5
136	<sup>13</sup> C <sup>13</sup> CATG <sup>13</sup> CGAG <sup>13</sup> CTGATAA	17,9	16	5
137	<sup>13</sup> C <sup>13</sup> CATG <sup>13</sup> CGAG <sup>13</sup> CTGATA	23,9	15	5
138	<sup>13</sup> C <sup>13</sup> CATG <sup>13</sup> CGAG <sup>13</sup> CTGAT	87,6	14	5
139	<sup>13</sup> C <sup>13</sup> CATG <sup>13</sup> CGAG <sup>13</sup> CTGA	24,6	13	5
140	<sup>13</sup> C <sup>13</sup> CATG <sup>13</sup> CGAG <sup>13</sup> CTG	23,1	12	5

4. Каждый нуклеотид имеет 2'-О-метоксиэтильную (2'-О-МОЕ)-модификацию, а <sup>13</sup>C означает 5-метилцитозин. Межнуклеозидные связи являются фосфодиэфирами. Каждый олигонуклеотид имеет линкер (L1), присоединенный к 3'-концу ASO посредством фосфатного мостика, и имеет следующую структуру:



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

Величины IC<sub>50</sub> для выбранных 12-25-мерных 2'-О-МОЕ-стерических блокаторов с фосфодиэфирными межнуклеозидными связями были определены, как описано выше и приведены в табл. 6.

Был синтезирован ряд 12-25-мерных 2'-О-МОЕ-стерических блокаторов с фосфоритоатными межнуклеозидными связями, и величины IC<sub>50</sub> для некоторых из этих стерических блокаторов представлены в табл. 7.

Таблица 6

IC<sub>50</sub> выбранных 12-25-мерных 2'-О-МОЕ-стерических блокаторов с фосфодиэфирными межнуклеозидными связями

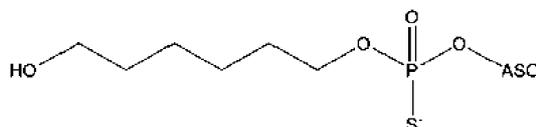
ASO SEQ ID NO	IC <sub>50</sub> (нМ)	Длина ASO
103	2728	21
105	860	19
106	1793	18
107	838	17
108	791	16
109	512	15
110	728	14
131	682	21
133	1074	19
134	1482	18
135	574	17
136	544	16
137	555	15
138	1153	14
117	25610	21
120	4702	18
121	1002	17
122	1851	16
123	1870	15
124	2970	14

Таблица 7

IC<sub>50</sub> выбранных 12-25-мерных 2'-О-МОЕ-стерических блокаторов с фосфортиоатными межнуклеозидными связями

SEQ ID NO	Последовательность ASO <sup>5</sup>	IC <sub>50</sub> (нМ)	Длина ASO
108	G <sup>m</sup> CAT <sup>m</sup> CGT <sup>m</sup> CAG <sup>m</sup> CTTA <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C	193	16
111	G <sup>m</sup> CAT <sup>m</sup> CGT <sup>m</sup> CAG <sup>m</sup> CTT	353	13
109	G <sup>m</sup> CAT <sup>m</sup> CGT <sup>m</sup> CAG <sup>m</sup> CTTA <sup>m</sup> C	426	15
107	G <sup>m</sup> CAT <sup>m</sup> CGT <sup>m</sup> CAG <sup>m</sup> CTTA <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CT	579	17
140	<sup>m</sup> C <sup>m</sup> CATG <sup>m</sup> CGAG <sup>m</sup> CTG	877	12
139	<sup>m</sup> C <sup>m</sup> CATG <sup>m</sup> CGAG <sup>m</sup> CTGA	930	13
135	<sup>m</sup> C <sup>m</sup> CATG <sup>m</sup> CGAG <sup>m</sup> CTGATAAAA	1201	17
134	<sup>m</sup> C <sup>m</sup> CATG <sup>m</sup> CGAG <sup>m</sup> CTGATAAAA	1398	18

5. Каждый нуклеотид имеет 2'-О-метоксиэтильную (2'-О-МОЕ)-модификацию, а <sup>m</sup>C означает 5-метилцитозин. Межнуклеозидные связи являются фосфортиоатами. Каждый олигонуклеотид имеет линкер (L1), присоединенный к 3'-концу ASO посредством фосфатного мостика, и имеет следующую структуру:



Пример 5. Ингибирование экспрессии человеческого Тау в клетках SH-SY5Y под действием 17-мерных 2'-О-МОЕ-стерических блокаторов.

2'-МОЕ-стерические блокаторы, которые имеют длину 17 нуклеозидов, были сконструированы так, чтобы они были нацелены на конститутивные экзоны в человеческом Тау. Эти 17-мерные 2'-О-МОЕ-

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

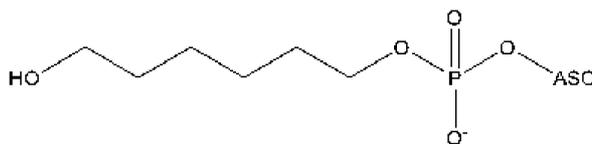
Таблица 8

Ингибирование мРНК tau в клетках SH-SY5Y под действием 17-мерных МОЕ-стерических блокаторов

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

186	ATGATGGATGTTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTA	46,4	11
187	TGATGGATGTTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTAA	40,9	11
188	GATGGATGTTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTAAT	53,6	11
189	TTTTA <sup>m</sup> CTT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTGG <sup>m</sup> C	130,4	12
190	ATTTA <sup>m</sup> CTT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTGG	111,2	12
191	GATTTA <sup>m</sup> CTT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTG	119,6	12
192	AGATTTA <sup>m</sup> CTT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CT	123,1	12
193	ATTT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAGGGA	78,0	12
194	TTT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAGGGA <sup>m</sup> C	76,1	12
195	TT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAGGGA <sup>m</sup> CG	71,5	12
196	T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAGGGA <sup>m</sup> CGT	89,0	12
197	AAGGT <sup>m</sup> CAG <sup>m</sup> CTTGTGGGT	62,1	13
198	GAAGGT <sup>m</sup> CAG <sup>m</sup> CTTGTGGG	49,9	13
199	GGAAGGT <sup>m</sup> CAG <sup>m</sup> CTTGTGG	59,3	13
200	<sup>m</sup> CGGAAGGT <sup>m</sup> CAG <sup>m</sup> CTTGTG	51,9	13
201	A <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> CTTGG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAGGG	116,5	13
202	<sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> CTTGG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAGGGA	106,1	13
203	<sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> CTTGG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAGGGAG	105,3	13
204	<sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> CTTGG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAGGGAGG	133,6	13

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



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

Пример 6. Ингибирование экспрессии человеческого Тау в клетках Nuh7 посредством 5-10-5-гапмеров.

Последовательности антисмысловых олигонуклеотидов были сконструированы так, чтобы они были комплементарны самой короткой изоформе tau, т.е. мРНК варианта транскрипта 4 (GenBank: NM\_016841.4). Анализы BLAST проводили для каждой олигонуклеотидной последовательности во избежание гибридизации с молекулой, не являющейся мишенью. Недавно сконструированные модифицированные химерные антисмысловые олигонуклеотиды представляли собой 5-10-5-гапмеры длиной 20 нуклеозидов, где центральный гэп-сегмент содержит десять 2'-дезоксинуклеозидов и фланкирован сегментами крыла в 5'-направлении и в 3'-направлении, включающими пять нуклеозидов, каждый из которых имеет 2'-О-МОЕ-модификацию сахара рибозы. Межнуклеозидными связями в каждом гапмере являются фосфортиоатные (P=S) связи.

Гапмеры, нацеленные на tau, были протестированы на ингибирование экспрессии мРНК человеческого tau in vitro. Клетки Nuh7 высевали при плотности 10000 клеток на лунку и трансфецировали реагентом OptiFect (Lifetech Cat # 12579-017) под действием 25 нМ антисмыслового олигонуклеотида. После обработки в течение 48 ч кДНК непосредственно выделяли из культивированных клеток с использованием мультиплексного набора для клеток Fastlane (Qiagen Cat # 216513). Уровни мРНК tau измеряли с помощью количественной ПЦР в реальном времени в дуплексной ОТ-ПЦР с использованием зондов TaqMan, специфичных к человеческому MAPT (LifeTech AssayID # Hs00902194\_m1: FAM-MGB) и человеческому ТВР (белку, связывающемуся с ТАТА-боксом), используемому в качестве эндогенного контроля (LifeTech Cat # 4326322E). Все данные были скорректированы по количеству исходной кДНК, а уровни мРНК tau нормализованы по уровням эндогенного эталонного гена ТВР. Ген tau и контрольный ген ТВР амплифицировали в одной и той же реакции ПЦР с аналогичной высокой эффективностью, что позволяло проводить относительную количественную оценку методом ΔΔСТ. Результаты представлены как процент остаточной мРНК tau по отношению к контрольным клеткам, обработанным PBS. В табл. 9 проиллюстрированы активности этих гапмеров в клетках Nuh7.

## Ингибирование мРНК Тау посредством 5-10-5-МОЕ-гапмеров в клетках Нuh7

SEQ ID NO	Последовательность ASO <sup>8</sup>	% Остаточной мРНК <sup>9</sup>
205	C*C*G*T*A*CGTCCCAGCGT*G*Д*Т*С*	22,5
206	G*G*С*Т*С*AGCCATCCTGG*Т*Т*С*А*	26,4
207	С*С*С*G*Т*ACGTCCCAGCG*Т*G*А*Т*	29
208	G*G*Т*Т*G*ACATCGTCTGC*С*Т*G*Т*	29,1
209	G*G*G*С*Т*С*AGCCATCCTG*G*Т*Т*С*	30,1
210	G*G*С*С*А*GCGTCCGTGTC*А*С*С*С*	32,8
211	G*G*С*Т*С*ТCCCAGCGGCA*А*G*G*А*	32,8
212	С*С*С*Т*С*ТTGGTCTTGGT*G*С*А*Т*	33,2
213	С*G*G*G*А*СCTGCCTCCCA*G*А*С*С*	33,6
214	G*С*Т*G*G*ТCTGTGGG*Т*С*С*С*	34,5
215	G*G*G*С*Т*С*ТCTCCATGTC*А*А*С*А*	34,6
216	G*G*Т*С*Т*CTGTGGGTCC*С*А*G*G*	34,9
217	G*G*G*А*С*CTGCCTCCCAG*А*С*С*С*	35,2
218	С*С*С*А*А*CCCGTACGTCC*С*А*G*С*	37,4
219	G*С*Т*Т*С*G*ТCTCCAGGC*Т*G*G*G*	39
220	С*С*G*Т*G*ТCACCCCTCTG*G*Т*С*Т*	40,8
221	С*Т*Т*G*G*С*ТCTCCCAGCG*G*С*А*А*	40,8
222	С*G*G*С*С*ТCCTTAGCTGC*Т*А*G*А*	41,7
223	С*А*G*С*G*ТCCGTGTCACC*С*Т*С*Т*	42,8
224	G*С*Т*С*А*GCCATCCTGGT*Т*С*А*А*	42,9
225	С*С*Т*G*G*ACTTTGCCTTC*С*С*Т*Т*	43,5
226	G*Т*С*С*С*ACTCTTGTC*Т*G*G*А*	44,1
227	А*С*С*Т*G*GCCACCTCCTG*G*Т*Т*Т*	45
228	Т*Т*G*G*С*ТTGGCGTTCT*С*G*С*G*	45,1
229	С*G*С*Т*Т*CCAGTCCCCTC*Т*Т*Т*G*	46,4
230	G*G*Т*G*А*ТCACCTCTGCC*С*Т*С*G*	46,4
231	G*G*Т*А*С*ТCCTGCAACC*А*А*С*С*	47,7
232	С*А*С*G*Т*GGCTTCCTCTC*С*С*А*С*	49,4
233	G*С*G*Т*С*CGTGTACCCCT*С*Т*Т*G*	50,6
234	С*А*С*С*С*ТCTGGTCTTG*G*Т*G*С*	52,3
235	G*Т*С*С*С*AGCGTGATCTT*С*С*А*Т*	52,5
236	G*С*С*А*G*CACTGATCACC*С*Т*А*А*	53,1
237	Т*G*G*Т*С*ТCTGTGGGTC*С*С*А*G*	53,6

238	C*C*G*C*C*TCCC GGCTGGT*G*C*T*T*	55,6
239	G*G*C*C*A*CACGAGTCCCA*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*A*C*T*GGCCACCTCCT*G*G*T*T*	58,9
243	C*C*C*G*C*CTCCC GGCTGG*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*CACTCACAC*A*A*G*G*	61,1
246	C*C*C*A*A*TCCTTGCTGTG*G*T*C*G*	61,4
247	G*G*G*T*C*CCACTCTTG*G*C*T*G*	62,9
248	G*C*T*T*C*GAGTCCCCTT*T*T*G*C*	63
249	C*C*C*T*T*CTCCACAGGC*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*TGCCCTGTGA*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*CTTCCATCCT*G*G*T*G*	63,7
254	G*C*C*T*G*GACTTTGCCTT*C*C*T*	64,3
255	G*C*C*T*C*TAAGTCCGTTGG*C*T*G*C*	65,1
256	G*A*T*C*C*GAGCCCTCC*G*T*A*T*	66,3
257	C*A*A*T*C*CTGCGCCGCAA*G*C*A*	66,7
258	G*C*C*T*C*CCGGCTGGTGC*T*T*A*	66,8
259	G*T*G*C*CTGGACTTTGCC*T*T*C*	67,1
260	C*T*G*C*CTAGCCTCTGT*G*A*A*	69,7
261	C*C*T*G*G*CCACCTCCTGG*T*T*A*	70,3
262	G*G*G*T*G*CTTGCCCTT*C*A*T*	71,1
263	C*C*A*C*CTCCACTTCTG*T*G*T*	71,8
264	G*T*G*C*CTAGGCCCTTGC*T*A*A*	74,6
265	C*T*G*G*C*AGCTTGCCCTT*C*T*T*	75,9
266	C*T*C*C*GGCTGGTGC*T*A*G*G*	76,2
267	C*G*C*CTCCC GGCTGGT*G*C*T*	78
268	C*T*G*G*C*CACCTCCTGGT*T*T*A*T*	78,7
269	G*G*C*A*CTCCTGGTTT*A*T*G*A*	79,1
270	C*C*A*T*CTGGTGCCACC*A*C*T*G*	82,9
271	C*C*T*G*C*GAGCTTGCCCTT*C*T*	83,7
272	A*A*T*C*CTGCTGTGGTC*G*C*A*G*	83,7
273	G*C*C*A*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*AGTGGTTCTC*T*A*G*T*	88
276	C*C*T*C*CGGCTGGTGC*T*A*G*	88,8
277	C*T*C*CTGCCAGCTTGCC*T*T*	92,2
278	C*T*T*CTCCTCCGGCCAC*T*A*G*T*	93,6
279	C*T*C*CTCCGGCCACTAG*T*G*G*	94,2
280	C*C*T*CTCCTCCGGCCA*C*T*A*G*	94,9
281	G*A*G*C*CTTCTCCTCCGG*C*A*A*	105,7
282	G*C*C*T*CTCCTCCGGCC*A*C*T*A*	112,5
283	C*C*T*TA*CTGCTAGCTG*G*C*G*T*	128,7

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

9. % Остаточной мРНК означает уровень мРНК tau в клетках Nuh7, обработанных одной дозой 25

нМ ASO tau в течение 48 ч, по сравнению с уровнем мРНК tau в контрольных клетках Huh7, обработанных PBS.

Пример 7. Ингибирование экспрессии человеческого Тау в клетках SH-SY5Y под действием 5-10-5-гапмеров.

Гапмеры, которые значительно снижают уровень экспрессии мРНК tau, как описано в примере 6, были отобраны и протестированы в клетках SH-SY5Y. Культивируемые клетки SH-SY5Y подвергали нуклеофекции под действием 2000 нМ антисмыслового олигонуклеотида. После обработки в течение приблизительно 24 ч кДНК непосредственно выделяли из культивированных клеток с использованием мультиплексного набора для клеток Fastlane (Qiagen Cat # 216513). Уровни мРНК tau были измерены с помощью количественной ПЦР в реальном времени с использованием дуплексной ОТ-ПЦР. Были использованы зонды Taqman, специфичные к человеческому MAPT (Lifetech AssayID # Hs00902194\_m1: FAM-MGB) и человеческому GAPDH (LifeTech AssayID # Hs02758991\_g1: VIC-MGB). Все данные были скорректированы по количеству исходной кДНК, а уровни мРНК tau нормализованы по уровням эндогенного эталонного гена GAPDH. Ген tau и контрольный ген GAPDH амплифицировали в одной и той же реакции ПЦР с аналогичной высокой эффективностью, что позволяло проводить относительную количественную оценку методом ΔΔСТ. Результаты представлены как процент остаточной мРНК tau по отношению к контрольным клеткам, обработанным PBS. В табл. 10 проиллюстрированы активности отобранных 5-10-5-гапмеров в клетках SH-SY5Y. Величины IC<sub>50</sub> для отобранных 5-10-5-гапмеров с 5-метилцитозинами определяли в клетках SH-SY5Y как описано выше, и эти величины представлены в табл. 11.

Таблица 10

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

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

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

Таблица 11

IC<sub>50</sub> выбранных 5-10-5-гапмеров с 5-метилцитозинами в клетках SH-SY5Y

SEQ ID NO	Последовательность ASO <sup>11</sup>	IC <sub>50</sub> (нМ)
284	<sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*G*Т*Д* <sup>m</sup> CGТ <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAG <sup>m</sup> CGТ*G*Д*Т* <sup>m</sup> C*	331
285	G*G*Т*Т*G*А <sup>m</sup> CAT <sup>m</sup> CGТ <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*Т*G*Т*	170
286	G*G*G* <sup>m</sup> C*Т* <sup>m</sup> CAG <sup>m</sup> CAT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTG*G*Т*Т* <sup>m</sup> C*	268
287	G*G* <sup>m</sup> C*Т* <sup>m</sup> C*Т <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAG <sup>m</sup> CGG <sup>m</sup> CA*А*G*G*А*	78
288	<sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*Т* <sup>m</sup> C*ТТGGТ <sup>m</sup> CTTGGТ*G* <sup>m</sup> C*А*Т*	366
289	G* <sup>m</sup> C*Т*G*G*Т <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTGТTGGG*Т* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*	133
290	G*Т* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*А <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CTTGTG <sup>m</sup> C*Т*G*G*А*	458
291	G*G*G* <sup>m</sup> C*Т* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CATGТ <sup>m</sup> C*А*А* <sup>m</sup> C*А*	118

11. Нуклеотиды с \* имеют модификацию 2'-О-МОЕ; нуклеотиды без \* представляют собой 2'-дезоксинуклеозиды, а <sup>m</sup>C означает 5-метилцитозин. Межнуклеозидными связями являются фосфориотатные связи.

Пример 8. Характеризация антисмыслового олигонуклеотида, нацеленного на MAPT.

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

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

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

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

Получение мышей, трансгенных по человеческому Tau (hTau).

Векторы ВАС (pBACe3.6), содержащие человеческий ген tau MAPP, были получены из человеческих геномных библиотек, поставляемых компанией Life Technologies. Три вектора, предположительно содержащие все регуляторные области гена MAPP, были подвергнуты скринингу. Человеческую геномную ДНК подвергали стандартной ПЦР для анализа на присутствие каждого экзона и праймеров, охватывающих интроны гена человеческого tau, а регуляторные области также использовали для определения последовательности клонов. Сравнение с человеческой ДНК показало, что один клон (RP11669E14) был интактным для всех частей гена tau. Этот вектор ВАС был использован для получения hTau-трансгенных мышей ВАС. Очищенную ДНК вводили в оплодотворенные эмбрионы мышей C57BL/6. Хвостовую часть ДНК, выделенную у детенышей, гидролизировали рестрикцирующими ферментами и гибридизовали с экзон-специфическими зондами с использованием аналогичным образом гибридизованной человеческой ДНК в качестве контроля для анализа на целостность трансгена. Было получено потомство позитивных детенышей. Было получено несколько hTau-трансгенных линий ВАС, и одна линия указывала на экспрессию мРНК и белка человеческого MAPP (фиг. 2А-2С). Эта линия экспрессировала все шесть транскриптов и изоформ белков, присутствующих в человеческом головном мозге (фиг. 2А-2С). Гетерозиготные hTau-трансгенные мыши ВАС несут одну копию трансгена и имеют уровни экспрессии РНК и белка человеческого tau, сравнимые с уровнем экспрессии эндогенного мышинового Tau.

*In vitro* ингибирование человеческого Tau под действием антисмысловых олигонуклеотидов.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Ингибирование мРНК Тау под действием 5-10-5-МОЕ-гапмеров в клетках NuH7 и SH-SY5Y

SEQ ID NO	Последовательность ASO <sup>14</sup>	% Остаточной	
		мРНК клетках SHSY5Y <sup>15</sup>	в Остаточной мРНК клетках NuH7 <sup>16</sup>
307	G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> T <sup>m</sup> CTGG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTGGA*G*G* *G*G*	66,8	34,7
308	T* <sup>m</sup> G* <sup>m</sup> G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> CTT <sup>m</sup> CTGG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTG*G*A* *G*G*	57,7	41,1
309	G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> G* <sup>m</sup> G* <sup>m</sup> TG <sup>m</sup> CTT <sup>m</sup> CAGGTT* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> C*A*	60,4	42,7
310	T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> A* <sup>m</sup> G* <sup>m</sup> G* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> CAA <sup>m</sup> CTGGTTT* <sup>m</sup> G* <sup>m</sup> T*A* *G*	30,5	37,3
311	T* <sup>m</sup> G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> AGGT <sup>m</sup> CAA <sup>m</sup> CTGG* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> T* T*G*	42,6	35,5
312	T* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> CAGGT <sup>m</sup> CAA <sup>m</sup> CTG* <sup>m</sup> G* <sup>m</sup> T* T*T*	44,9	44,7
313	<sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> CAGGT <sup>m</sup> CAA <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> G* *G*T*	10,3	20,9
314	<sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> TT <sup>m</sup> CTA <sup>m</sup> CATGGA*G*G* *G*G*	67,7	51,3
315	T* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CTT <sup>m</sup> CTA <sup>m</sup> CA* <sup>m</sup> T* G*G*A*	76,7	95,1
316	<sup>m</sup> C* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CTT <sup>m</sup> CTA <sup>m</sup> C*A* T*G*G*	68,2	77,6
317	<sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CTT <sup>m</sup> CTA* <sup>m</sup> C* *A*T*G*	50,4	72,3
318	<sup>m</sup> C*A*A*A* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> CTTGTG <sup>m</sup> CT* <sup>m</sup> G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A*	33,6	54,4
319	T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> A*A*A* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> CTTGTG <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*	28,5	44,5
320	T* <sup>m</sup> G* <sup>m</sup> G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CGAA <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CA* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A*A*	24,2	55,1
321	G* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> G* <sup>m</sup> G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CGAA <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A*	22,9	51,6

322	T*G*T*G*G* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CGAA <sup>m</sup> CA* <sup>m</sup> C*A* * <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*	25, 4	62, 4
323	<sup>m</sup> C*T*G*T*G*G* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CGAA <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*	31, 1	49, 2
324	<sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*T*G*T*G* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CGAA* <sup>m</sup> C* A* <sup>m</sup> C*A*	34, 8	56, 7
325	G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*T*G*T*G* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CGA*A* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*	31, 4	51, 3
326	T*G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*T*G*T*G* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CG*A*A* * <sup>m</sup> C*A*	24, 2	50, 2
327	<sup>m</sup> C*T*G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*T*G* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> C*G* A*A* <sup>m</sup> C*	18, 9	56, 7
328	T* <sup>m</sup> C*T*G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> C* G*A*A*	25, 0	43, 7
329	G*T* <sup>m</sup> C*T*G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA* <sup>m</sup> C* C*G*A*	10, 1	35, 5
330	<sup>m</sup> C*G*T* <sup>m</sup> C*T*G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA* <sup>m</sup> C* A* <sup>m</sup> C*G*	12, 6	37, 9
331	T* <sup>m</sup> C*G*T* <sup>m</sup> C*T*G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA* <sup>m</sup> C* C*A* <sup>m</sup> C*	9, 1	44, 6
332	A*T* <sup>m</sup> C*G*T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA* <sup>m</sup> C* * <sup>m</sup> C*A*	18, 8	55, 4
333	<sup>m</sup> C*A*T* <sup>m</sup> C*G*T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA* <sup>m</sup> C* * <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*	17, 1	62, 3
334	A* <sup>m</sup> C*A*T* <sup>m</sup> C*G*T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA* <sup>m</sup> C* *T* <sup>m</sup> C*	14, 3	57, 7
335	G*A* <sup>m</sup> C*A*T* <sup>m</sup> C*G*T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*T*	11, 7	33, 5
336	T*G*A* <sup>m</sup> C*A*T* <sup>m</sup> C*G*T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA* <sup>m</sup> C* G* <sup>m</sup> C*	15, 2	38, 4
337	T*T*G*A* <sup>m</sup> C*AT <sup>m</sup> C*G*T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA* <sup>m</sup> C* G*G*	26, 2	43, 3
338	G*T*T*G*A* <sup>m</sup> C*AT <sup>m</sup> C*G*T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA* <sup>m</sup> C* T*G*	18, 0	44, 5
285	G*G*T*T*G*A* <sup>m</sup> C*AT <sup>m</sup> C*G*T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA* <sup>m</sup> C* T*	17, 2	42, 7

	G*T*		
339	A*G*G*T*T*GA <sup>m</sup> CAT <sup>m</sup> CGT <sup>m</sup> CTG* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> T*G*	23,4	48,9
340	A*A*G*G*T*TGA <sup>m</sup> CAT <sup>m</sup> CGT <sup>m</sup> CT*G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*T*	17,2	38,6
341	<sup>m</sup> C*A*A*G*G*T*TGA <sup>m</sup> CAT <sup>m</sup> CGT <sup>m</sup> C*T*G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*	25,7	47,4
342	A* <sup>m</sup> C*A*A*G*G*T*TGA <sup>m</sup> CAT <sup>m</sup> CGT* <sup>m</sup> C*T* G* <sup>m</sup> C*	24,3	43,0
343	<sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*A*A*GGTGA <sup>m</sup> CAT <sup>m</sup> CG*T* <sup>m</sup> C* T*G*	28,9	52,9
344	A* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*A*AGGTGA <sup>m</sup> CAT <sup>m</sup> C*G*T* <sup>m</sup> C*T*	23,0	51,4
345	<sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*A*AGGTGA <sup>m</sup> CAT* <sup>m</sup> C*G* T* <sup>m</sup> C*	33,5	78,2
346	T* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> CAAGGTGA <sup>m</sup> CA*T* <sup>m</sup> C* G*T*	44,4	60,4
347	<sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> CAAGGTGA <sup>m</sup> C*A*T* <sup>m</sup> C*G*	35,4	67,6
348	A* <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> CAAGGTGA* <sup>m</sup> C*A* T* <sup>m</sup> C*	61,9	66,1
349	<sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CAAGGTG*A* <sup>m</sup> C *A*T*	67,3	72,0
350	A* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CAAGGT*G*A* <sup>m</sup> C*A*	64,0	72,7
351	<sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CAAGGT*T*G *A* <sup>m</sup> C*	46,3	64,8
352	T* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CAAGG*T*T *G*A*	55,9	73,2
353	G*T* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CAAG*G*T *T*G*	31,9	53,3
354	<sup>m</sup> C*G*T* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CAA*G* G*T*T*	29,1	57,6
355	<sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*G*T* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CA*A* G*G*T*	33,5	57,7



	G*T*		
374	A*T*T*T*T*C*A <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CAGTAT*G*G* A*G*	51, 1	54, 0
375	A*A*T*T*T* <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CAGTA*T*G* G*A*	86, 4	67, 7
376	<sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*T*T*A*ATT <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> C*A* G*T*A*	35, 6	72, 8
377	<sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*T*T*AA <sup>m</sup> TT <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> C* A*G*T*	32, 4	60, 4
378	T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*T*TAAT <sup>m</sup> TT <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> *T* <sup>m</sup> C*A*G*	26, 7	71, 7
379	T*T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*TTAAT <sup>m</sup> TT <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> * T* <sup>m</sup> C*A*	20, 4	73, 9
380	<sup>m</sup> C*T*T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*TTAA <sup>m</sup> TT <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> C*	28, 1	86, 4
381	A* <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> TGTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTGGA <sup>m</sup> C*T*T* T*G*	32, 4	44, 6
382	<sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> TTGTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTGGA* <sup>m</sup> C*T* *T*T*	33, 4	58, 2
383	<sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> CTTGTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTGG*A* <sup>m</sup> C*T*T*	26, 8	68, 5
384	<sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> CTTGTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTG*G* A* <sup>m</sup> C*T*	16, 5	43, 4
385	T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> CTTGTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CT*G* G*A* <sup>m</sup> C*	10, 6	38, 9
386	G*T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CTTGTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C*T* G*G*A*	23, 0	37, 4
387	G*G*T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CTTGTG <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* T*G*G*	31, 0	36, 9
388	G*G*G*T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CTTGTG* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*T*G*	45, 9	47, 5
389	G*T*G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> CTGG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CAT* <sup>m</sup> C* T*G*T*	42, 8	81, 7
390	A*G*T*G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> CTGG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CA* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> C*T*G*	28, 1	51, 0

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

	T**C*		
409	T**C*A*T*A*GT**CA**CT**CTGGT**G*A* A*T*	45,8	65,5
410	**C*T*G*G*T**C**CT**CTGTGGGT**C**C* **C*A*	37,2	60,5
411	A*T**C**C*T*GTG**CT**CAGG**C**C*T *T**C*	31,2	66,6
412	A*A*T**C**C*T*GTG**CT**CAGG**C**C *T*T*	41,2	73,5
413	**C*T*A*A*T**C**CTGTG**CT**CA*G*G* **C**C*	38,7	65,1
414	**C**C*T*A*A*T**C**CTGTG**CT**C*A*G *G**C*	31,9	64,8
415	T**C**C*T*A*A*AT**C**CTGTG**CT**C*A *G*G*	45,9	73,6
416	G*T**C**C*T*AAT**C**CTGTG**CT**T**C *A*G*	50,0	80,9
417	A*G*T**C**C*TAA**C**CTGTG**C*T*T* **C*A*	51,9	77,1
418	**C*A*G*T**C**C**TAAT**C**CTGTG**C*T *T**C*	53,2	68,4
419	T**C*A*G*T**C**C**TAAT**C**CTGT**G**C *T*T*	58,9	78,3
420	T*T**C**A*G*C*T**C**C**TAAT**C**CTG**T*C* **C*T*	51,1	72,9
421	**C*T*T**C*A*GT**C**C**TAAT**C**CT*G*T *G**C*	49,4	69,1
422	G**C*T*T**C**C*AGT**C**C**TAAT**C**C*T*G *T*G*	39,5	56,8
423	G*G*A*G*T*TGTAAG**C**CT**C**C*T*T* T*G*	61,8	66,4
424	G**C*T*T**C*T*GGT**CAAGG**CTT*T*G* G*G*	33,8	49,8
425	T*G**C*T*T**C*TGGT**CAAGG**CT*T*T* G*G*	37,9	55,5

426	G*T*G* <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> CTGGT <sup>m</sup> CAAGG <sup>m</sup> C*T*T* T*G*	48,0	74,1
427	G*G*T*G* <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> CTGGT <sup>m</sup> CAAGG* <sup>m</sup> C*T* T*T*	51,4	68,7
428	T*G*A*G*G* <sup>m</sup> TG <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CTGGT <sup>m</sup> CA*A*G*G * <sup>m</sup> C*	38,0	72,9
429	T*T*T* <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> CATGG <sup>m</sup> CAG <sup>m</sup> CAG*A*T* G*G*	87,5	84,7
430	T*G* <sup>m</sup> C*T*G*AGTT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> TTAG*G* <sup>m</sup> C*A *G*	61,8	94,7
431	<sup>m</sup> C*T*G* <sup>m</sup> C*T*GAGTT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> TTA*G*G* <sup>m</sup> C*A*	51,5	61,1
432	G* <sup>m</sup> C*T*G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> TGAGTT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> TTA*G*G * <sup>m</sup> C*	46,5	94,4
433	G*G* <sup>m</sup> C*T*G* <sup>m</sup> CTGAGTT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> TT*A*G *G*	61,8	80,4
434	A*G*G* <sup>m</sup> C*T*G <sup>m</sup> CTGAGTT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T*T*A *G*	68,1	74,7
435	G*A*G*G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> TG <sup>m</sup> CTGAGTT <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> T *A*	52,3	83,7
436	T*G*A*G*G* <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> CTGAGTT <sup>m</sup> * <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> *T*	62,3	71,5
437	<sup>m</sup> C*T*G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*AAGT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CAG*G* G*T*T*	43,3	74,6
438	A* <sup>m</sup> C*T*G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> CAAGT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CA*G* G*G*T*	53,4	78,8
439	T*A* <sup>m</sup> C*T*G* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAAGT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> C*A* G*G*G*	34,5	74,9
440	<sup>m</sup> C*T*A* <sup>m</sup> C*T*G <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAAGT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CT* <sup>m</sup> C* A*G*G*	35,4	73,6
441	T* <sup>m</sup> C*T*A* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> TG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAAGT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> C*A*G*	65,7	84,0
442	T*T* <sup>m</sup> C*T*A* <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAAGT <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* T* <sup>m</sup> C*A*	47,9	93,1
443	T*T*T* <sup>m</sup> C*T*A* <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAAGT <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> 53,6	85,3	

	C*T* <sup>m</sup> C*		
444	A*T*T*T* <sup>m</sup> C*TA <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAAGT* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> T*	72, 4	100, 6
445	G*A*T*T*T* <sup>m</sup> CTA <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAAG* <sup>m</sup> C*	68, 6	79, 7
446	G*G*A*T*T*T* <sup>m</sup> CTA <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAA* <sup>m</sup> G*T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*	72, 1	88, 6
447	T*G*G*A*T*T*T* <sup>m</sup> CTA <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CA*A* <sup>m</sup> G* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> C*	65, 7	79, 7
448	<sup>m</sup> C*T*G*G*A*T*T*T* <sup>m</sup> CTA <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C*A*A* <sup>m</sup> G*T*	51, 0	68, 6
449	A*T* <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> T*AGG <sup>m</sup> CTGG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> A*A* <sup>m</sup> G*A*	43, 6	74, 1
450	T*G*A*T* <sup>m</sup> C*T*TAGG <sup>m</sup> CTGG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> A*A*	38, 8	70, 0
451	T*T*T*A*T* <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAG <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CT* <sup>m</sup> G*A* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> C*	51, 0	76, 2
452	A*T*T*T*A*T* <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAG <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> G* <sup>m</sup> A*T*	55, 2	77, 7
453	A*A*T*T*T* <sup>m</sup> AT <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAG <sup>m</sup> CA* <sup>m</sup> C*T*	68, 1	71, 1
454	T*A*T*A*T* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTAT <sup>m</sup> CTAG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*	60, 1	88, 2
455	G*T*A*T*A*T* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTAT <sup>m</sup> CTAG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> A* <sup>m</sup> C*	64, 2	85, 2
456	A*G*T*A*T* <sup>m</sup> AT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTAT <sup>m</sup> CTAG* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> A*	62, 8	86, 2
457	A*A* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> CAAGGG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CT*A*	83, 3	90, 7
458	G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> A* <sup>m</sup> A* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> CAGATG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAT*A*T* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> C*	50, 9	87, 2
459	G*G* <sup>m</sup> C*T*T* <sup>m</sup> AGGA <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTGA*A*A*	59, 8	71, 1
460	G*G* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> GATTGTGG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> A* <sup>m</sup> G* <sup>m</sup> G*	32, 3	51, 6

461	A*G*G* <sup>m</sup> C*A*TGATTGTGGG <sup>m</sup> C*T*T*A* G*	31,0	60,2
462	G*T*A*A* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTTT <sup>m</sup> CAAAG* <sup>m</sup> C*T* G*A*	50,2	63,6
463	G*G*T*A*A* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTTT <sup>m</sup> CAAA*G* <sup>m</sup> C* T*G*	27,1	51,9
464	G*G*G*T*A*A* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTTT <sup>m</sup> CAA*A*G* <sup>m</sup> C*T*	45,6	64,5
465	A*G*G*G*T*AA <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTTT <sup>m</sup> CA*A*A* G* <sup>m</sup> C*	60,3	61,5
466	<sup>m</sup> C*A*G*G*G*TAA <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTTT <sup>m</sup> C*A*A* A*G*	59,2	82,8
467	<sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A*G*G*GTA <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTTT* <sup>m</sup> C*A *A*A*	48,5	57,9
468	<sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A*G*GGTAA <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTTT* <sup>m</sup> C*A*A*	37,8	70,2
469	G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A*GGTAA <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTT* <sup>m</sup> T * <sup>m</sup> C*A*	31,9	58,2
470	T*G* <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> C*AA <sup>m</sup> CATGG <sup>m</sup> CAAA* <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> C*A*	42,1	70,5
471	T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*T*G* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAA <sup>m</sup> CATGG <sup>m</sup> C*A*A *A* <sup>m</sup> C*	45,2	77,7
472	G*T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*T*G* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAA <sup>m</sup> CATGG* <sup>m</sup> C*A *A*A*	42,9	64,0

14. Нуклеотиды с \* имеют модификацию 2'-O-МОЕ; нуклеотиды без \* представляют собой 2'-дезоксинуклеозиды, а <sup>m</sup>C означает 5-метилцитозин. Межнуклеозидными связями являются фосфоритионатные связи.

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

16. % Остаточной мРНК означает уровень мРНК tau в клетках Nuh7, обработанных одной дозой 25 нМ ASO tau в течение 48 ч, по сравнению с уровнем мРНК tau в контрольных клетках, обработанных PBS.

Гапмеры, которые в значительной степени снижают экспрессию мРНК tau, как показано в табл. 13, были отобраны и протестированы в клетках SH-SY5Y. Величины IC<sub>50</sub> отобранных 5-10-5-гапмеров с 5-метилцитозинами определяли в клетках SH-SY5Y, как описано выше, и результаты представлены в табл. 14.

IC<sub>50</sub> отобранных 5-10-5-гапмеров с 5-метилцитозином в клетках SH-SY5Y

SEQ ID NO	Последовательность ASO <sup>17</sup>	IC <sub>50</sub> (нМ)
313	<sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*T*T*G* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> CAGGT <sup>m</sup> CAA <sup>m</sup> C*T*G*G*T*	1115
327	<sup>m</sup> C*T*G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*TGTGG <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> C*G*A*A* <sup>m</sup> C*	844
329	G*T* <sup>m</sup> C*T*G* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTGTGG <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*G*A*	481
330	<sup>m</sup> C*G*T* <sup>m</sup> C*T*G* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTGTGG <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*G*	555
331	T* <sup>m</sup> C*G*T* <sup>m</sup> C*T*G* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTGTGG <sup>m</sup> CT* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*	818
332	A*T* <sup>m</sup> C*G*T* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTGTGG <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A*	918
333	<sup>m</sup> C*A*T* <sup>m</sup> C*G*T* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTGTGG* <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*	981
334	A* <sup>m</sup> C*A*T* <sup>m</sup> C*G <sup>m</sup> T <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTGTG*G* <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> C*	608
335	G*A* <sup>m</sup> C*A*T* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CGT <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTGT*G*G* <sup>m</sup> C*T*	414
336	T*G*A* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> T* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CGT <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTG*T*G*G* <sup>m</sup> C*	393
338	G*T*T*G*A* <sup>m</sup> CAT <sup>m</sup> CGT <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C*T*G*T*G*	588
340	A*A*G*G*T*TGA <sup>m</sup> CAT <sup>m</sup> CGT <sup>m</sup> CT*G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*T*	496
366	G*T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*AGGT <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> CAAA*G*T*G*G*	793
384	<sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> TGTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTG*G*A* <sup>m</sup> C*T*	810
385	T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTTGTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CT*G*G*A* <sup>m</sup> C*	954
404	G*T* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTGGTGAAT <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A*A*G*	12035
405	A*G*T* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTTGGTGAAT* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A*A*	743
381	A* <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> C*T*TGTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTGGA <sup>m</sup> C*T*T*T*G*	2737

17. Нуклеотиды с \* имеют модификацию 2'-О-МОЕ; нуклеотиды без \* представляют собой 2'-дезоксинуклеозиды, а <sup>m</sup>C означает 5-метилцитозин. Межнуклеозидными связями являются фосфортиоатные связи.

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

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

Таблица 15

Ингибирование мРНК Тау зеленой мартышки под действием 5-10-5-МОЕ-гапмеров в клетках Cos1

SEQ ID NO	Последовательность ASO <sup>18</sup>	% Остаточной мРНК tau <sup>19</sup>
285	G*G*T*T*G*A* <sup>m</sup> CAT <sup>m</sup> CGT <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*T*G*T*	39
284	<sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*G*T*A* <sup>m</sup> CGT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAG <sup>m</sup> CGT*G*A*T* <sup>m</sup> C*	61
473	<sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*G*T*A* <sup>m</sup> CGT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAG <sup>m</sup> CG*T*G*A*T*	62
474	G*G* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A*G* <sup>m</sup> CGT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CGTGT <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*	64
386	G*T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTTGTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CT*G*G*A*	53
335	G*A* <sup>m</sup> C*A*T* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CGT <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTGT*G*G* <sup>m</sup> C*T*	39
384	<sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*T* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> TGTG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTG*G*A* <sup>m</sup> C*T*	51
313	<sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*T*T*G* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> T <sup>m</sup> CAGGT <sup>m</sup> CAA <sup>m</sup> C*T*G*G*T*	37
366	G*T* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*AGGT <sup>m</sup> CTG <sup>m</sup> CAAA*G*T*G*G*	35
329	G*T* <sup>m</sup> C*T*G* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTGTGG <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C*G*A*	34
405	A*G*T* <sup>m</sup> C*A* <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTGGTGAAT* <sup>m</sup> C* <sup>m</sup> C*A*A*	37

18. Нуклеотиды с \* имеют модификацию 2'-О-МОЕ; нуклеотиды без \* представляют собой 2'-дезоксинуклеозиды, а <sup>m</sup>C означает 5-метилцитозин. Межнуклеозидными связями являются фосфортиоатные связи.

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

Некоторые антисмысловые олигонуклеотиды, которые значительно снижают уровень экспрессии

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

Таблица 16

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

SEQ ID NO	Последовательность ASO <sup>20</sup>	% Остаточной мРНК <sup>21</sup>
285	G*G*T*T*G*А <sup>м</sup> САТ <sup>м</sup> СГТ <sup>м</sup> СТГ <sup>м</sup> С* <sup>м</sup> С*Т*G*T*	9,8
475	<sup>м</sup> С* <sup>м</sup> С*А*Т*G* <sup>м</sup> С*G*А*G* <sup>м</sup> С*Т*G*А*Т*А*А*А*	20,9
476	G* <sup>м</sup> С*А*Т* <sup>м</sup> С*G*Т* <sup>м</sup> С*А*G* <sup>м</sup> С*Т*Т*А* <sup>м</sup> С* <sup>м</sup> С*Т*	40,0
477	<sup>м</sup> С*Т*Т*Т*G* <sup>м</sup> С*Т*Т*Т*А* <sup>м</sup> С*Т*G*А* <sup>м</sup> С* <sup>м</sup> С*	16,2
478	Т* <sup>м</sup> С*А*А* <sup>м</sup> С*Т*G*G*Т*Т*Т*G*Т*А*G*А* <sup>м</sup> С*	34,9

20. Нуклеотиды с \* имеют модификацию 2'-О-МОЕ; нуклеотиды без \* представляют собой 2'-дезоксинуклеозиды, а <sup>м</sup>С означает 5-метилцитозин. Межнуклеозидными связями являются фосфориотатные связи.

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

Пример 12. Тестирование in vivo гапмеров, нацеленных на MART.

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

Таблица 17

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

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

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

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

24. N/T=не тестировали.

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

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

Притязания на изобретение не являются ограничивающими и приводятся ниже.

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

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

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

9. Олигонуклеотид по любому из пп.1-8, где 2'-модификация выбрана из группы, состоящей из 2'-фтора, 2'-дезоксифтора, 2'-О-метила, 2'-О-метоксиэтила (2'-О-МО), 2'-О-аминопропила (2'-О-АР), 2'-О-диметиламиноэтила (2'-О-ДМАОЕ), 2'-О-диметиламинопропила (2'-О-ДМАР), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-О-ДМАЕОЕ) и 2'-О-N-метилацетида (2'-О-NМА).

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

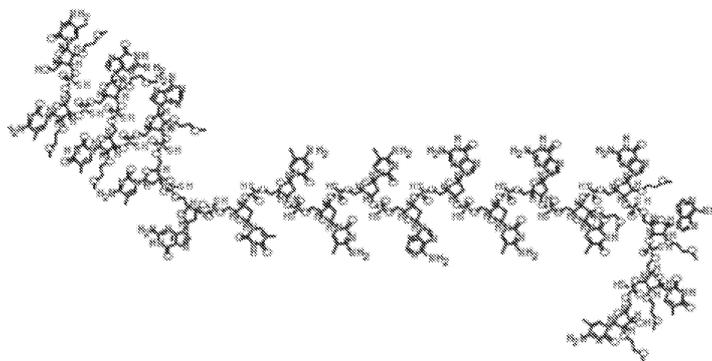
11. Олигонуклеотид по любому из пп.1-10, где олигонуклеотид обладает способностью снижать уровень экспрессии мРНК или белка tau по меньшей мере на 30% *in vitro* или по меньшей мере на 30% *in vivo*.

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

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

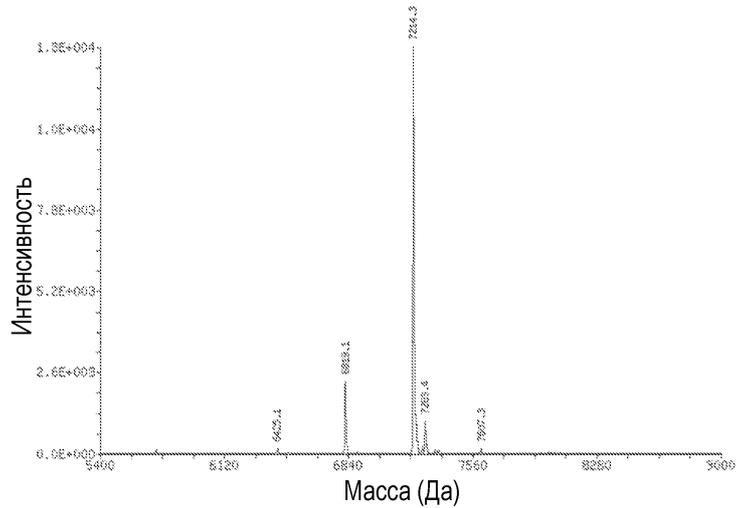
14. Применение по п.13, где tau-ассоциированное заболевание выбрано из болезни Альцгеймера (БА), амиотрофического бокового склероза/комплекса паркинсонизм-деменция (АБС-КПД), деменции в области аргирофильных зерен (ДАГЗ), амилоидной ангиопатии британского типа, церебральной амилоидной ангиопатии, хронической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

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



Фиг. 1А

036417

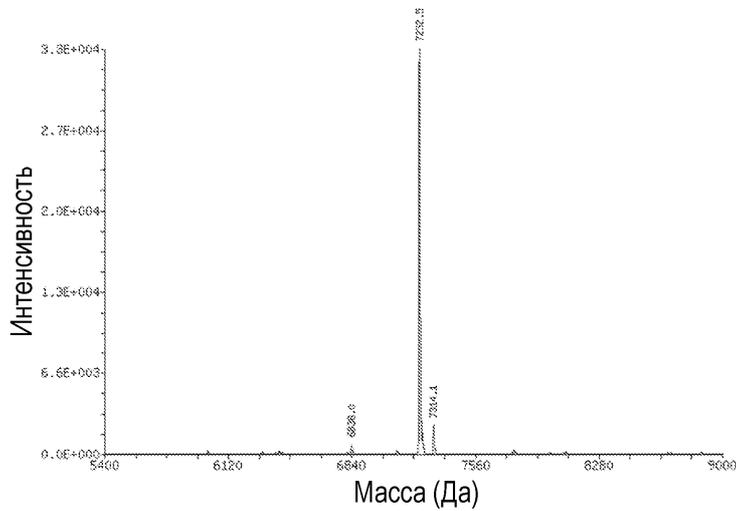


Фиг. 1B

Список пиков массы, отсортированных по интенсивности:

Масса (Da)	Ср. кв. откл.	Интенсивность	Оценка	Δ массы	% Относительных величин	Общий %	Предположительная идентичность Масса мишени: 7212,2
7264.3	0.2	1.000E+004	13.43	0.0	100.00	99.28	
6822.1	0.5	2.22E+003	8.38	-385.2	22.22	22.22	
7222.7	0.3	1.22E+003	8.75	35.4	12.2	12.22	
7288.9	0.6	1.04E+003	8.28	68.1	10.4	10.42	
6822.8	0.7	9.82E+002	8.32	-387.3	9.82	9.82	
7287.0	0.8	2.22E+002	4.20	62.7	2.22	2.22	
7607.3	0.4	1.58E+002	3.21	385.0	1.58	1.58	
6422.1	0.5	1.86E+002	6.21	-789.2	1.86	1.86	

Фиг. 1C



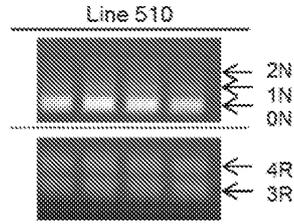
Фиг. 1D

Список пиков массы, отсортированных по интенсивности:

Масса (Da)	Ср. кв. откл.	Интенсивность	Оценка	Δ массы	% Относительных величин	Общий %	Предположительная идентичность Масса мишени: 7212,2
7212.1	0.2	3.32E+004	13.02	0.0	100.00	99.99	
7248.6	0.7	2.88E+003	8.28	16.0	8.8	8.89	
7314.1	0.2	2.30E+003	7.18	82.8	6.9	6.97	
6822.6	0.6	7.50E+002	8.13	-389.3	2.26	2.26	

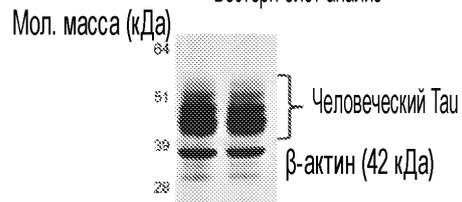
Фиг. 1E

Изоформы в переднем головном мозге  
ОТ-ПЦР-транскрипты



Фиг. 2А

Изоформы в переднем головном мозге  
Вестерн-блот-анализ



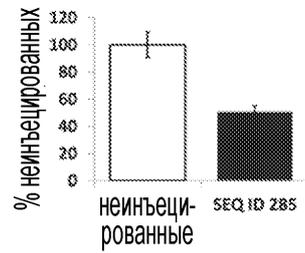
Фиг. 2В

Иммуногистохимический анализ на  
распределение человеческого Тау



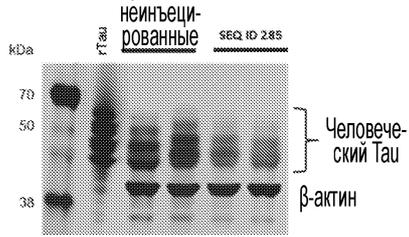
Фиг. 2С

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



Фиг. 2D

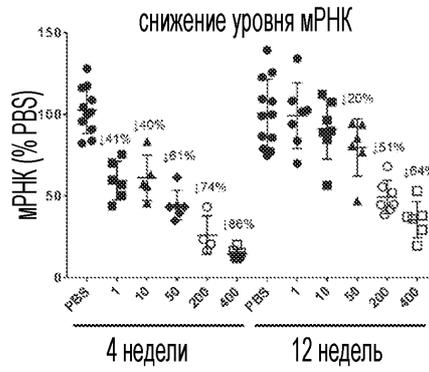
Ингибирование белка Тау через 4 недели после ASO-обработки гиппокампа



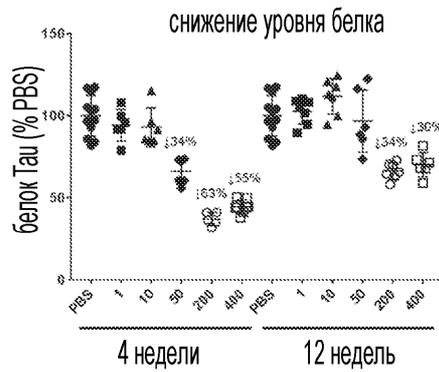
Фиг. 2Е



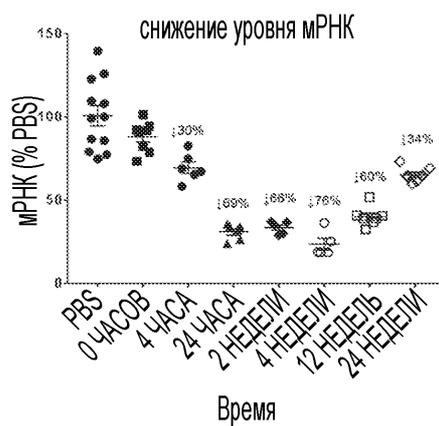
Фиг. 3



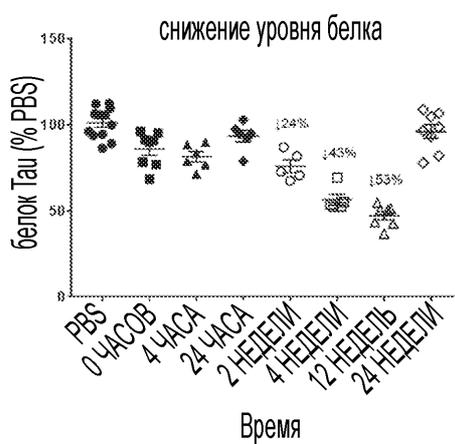
Фиг. 4А



Фиг. 4В



Фиг. 5А



Фиг. 5В

