

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092156** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.04.01

(22) Дата подачи заявки
2019.03.13

(51) Int. Cl. *C07H 21/00* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(54) **МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ ТАУПАТИЙ**

(31) **62/642,499**

(32) **2018.03.13**

(33) **US**

(86) **PCT/EP2019/056312**

(87) **WO 2019/175260 2019.09.19**

(88) **2019.11.14**

(71) Заявитель:
ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА НВ (BE)

(72) Изобретатель:

Эбнет Андреас, Ван Утрив

Д'Идевалль Константин (BE), Грязнов

Сергей, Мартинес Монтеро Сауль,

Раджванши Вивек Кумар, Бейгельман

Леонид (US)

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

(57) Раскрыты олигонуклеотиды, содержащие модификации в 2'- и/или 3'-положении(ях), наряду со способами получения и применения против болезни Альцгеймера и других таупатий.

A1

202092156

202092156

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-564558EA/032

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ ТАУПАТИЙ

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0001] Средства терапии на основе антисмысловых олигонуклеотидов были рассмотрены для лечения или предупреждения различных заболеваний и состояний, таких как вирусные заболевания, неврологические заболевания, нейродегенеративные заболевания, фиброзные заболевания и гиперпролиферативные заболевания.

[0002] Нейродегенеративные заболевания, ассоциированные с патологической агрегацией тау-белка в нейрофибриллярных или глиофибриллярных клубках в головном мозге человека, известны как таупатии. Клубки состоят из гиперфосфорилированного тау-белка, ассоциированного с микротрубочками, агрегированного в нерастворимой форме. Нейрофибриллярные клубки (NFT) могут приводить к гибели нейронов и, следовательно, быть основным причинным фактором в таупатиях, включая болезнь Альцгеймера.

[0003] Болезнь Альцгеймера (AD) представляет собой хроническое нейродегенеративное нарушение головного мозга и составляет 50-70% всех случаев деменции. Примерно 47 миллионов человек во всем мире живут с деменцией, и ожидается, что к 2050 году их число вырастет до 131 миллиона. Доступны только симптоматические методы лечения, что свидетельствует о необходимости поиска средств терапии, модифицирующих заболевание, которые замедляют или даже останавливают прогрессирование заболевания.

[0004] Патологически AD характеризуется аномальным накоплением внеклеточных β -амилоидных бляшек и внутриклеточным образованием NFT, состоящих из гиперфосфорилированных тау-белков. Тау представляет собой белок, ассоциированный с микротрубочками (MAP), кодируемый геном MAPT. Локализация и интенсивность накопления NFT сильно коррелируют со снижением когнитивных функций при AD, и мутации в гене MAPT вызывают лобно-височную деменцию с паркинсонизмом (FTD). На эти факты основана разработка средств терапии, направленных на тау-белок. Уменьшение агрегации, удаление внутриклеточных агрегатов, остановка распространения, увеличение внутриклеточного клиренса и изменение посттрансляционных модификаций являются некоторыми терапевтическими стратегиями, направленными на уменьшение проявления патологии, связанной с тау-белком.

[0005] Антисмысловые олигонуклеотиды (ASO) представляют собой небольшие одонитевые молекулы нуклеиновой кислоты, которые связываются со своими РНК-мишенями посредством классического спаривания оснований по Уотсону-Крику, приводящего в результате к образованию дуплекса ASO:РНК. В зависимости от химических модификаций фосфатно-сахарного остова образованный дуплекс ASO:РНК может привлекать РНКазу-Н, которая расщепляет нить РНК дуплекса, оставляя ASO нетронутым. Затем расщепленная РНК дополнительно подвергается дальнейшему

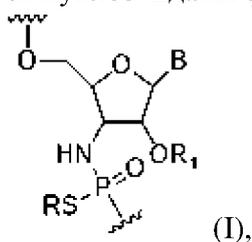
разрушению, что приводит к снижению уровней экспрессии mRNA и белка целевого гена. Вследствие химических модификаций остова ASO могут также изменяться аффинность связывания, устойчивость к нуклеазной активности и способность связывания с (сывороточными) белками.

[0006] Соответственно, в данной области техники существует потребность в открытии и разработке новых средств терапии с различными механизмами действия, повышенной эффективностью, повышенной аффинностью и/или уменьшенными побочными эффектами.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

[0007] Настоящее изобретение относится к соединениям и композициям, содержащим олигонуклеотиды, и их применению в предупреждении или лечении заболеваний и состояний, например таупатий, таких как болезнь Альцгеймера.

[0008] Некоторые варианты осуществления предусматривают олигонуклеотид, содержащий последовательность, комплементарную по меньшей мере части последовательности гена MAPP, где один или более нуклеотидов олигонуклеотида являются нуклеотидами формулы (I),

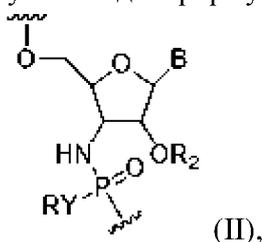


где R представляет собой H или положительно заряженный противоион, B представляет собой нуклеиновое основание,

R_1 представляет собой $-(CR'_2)_2OCR'_3$, и R' независимо в каждом случае представляет собой H или F. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид указанного олигонуклеотида является нуклеотидом формулы (I). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит от 2 до 40 нуклеотидов формулы (I). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит 2-26 нуклеотидов формулы (I). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит 5-10 нуклеотидов формулы (I). В некоторых вариантах осуществления B представляет собой немодифицированное нуклеиновое основание в по меньшей мере одном нуклеотиде формулы (I). В некоторых вариантах осуществления B представляет собой модифицированное нуклеиновое основание в по меньшей мере одном нуклеотиде формулы (I). В некоторых вариантах осуществления B представляет собой немодифицированное нуклеиновое основание в каждом нуклеотиде формулы (I). В некоторых вариантах осуществления B представляет собой модифицированное нуклеиновое основание в каждом нуклеотиде формулы (I). В некоторых вариантах осуществления каждый R' представляет собой H в по меньшей мере одном нуклеотиде формулы (I). В некоторых вариантах осуществления каждый R' представляет собой H в каждом нуклеотиде формулы (I). В некоторых вариантах осуществления R_1 представляет собой $-(CH_2)_2OCH_3$ в по меньшей мере одном нуклеотиде

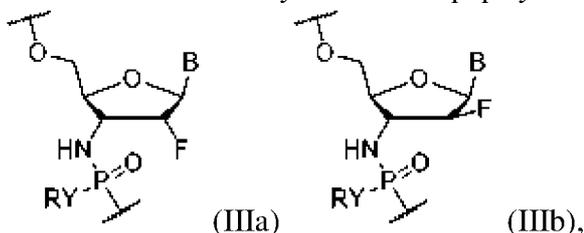
формулы (I). В некоторых вариантах осуществления R_1 представляет собой $-(CH_2)_2OCH_3$ в каждом нуклеотиде формулы (I).

[0009] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит один или более нуклеотидов формулы (II),



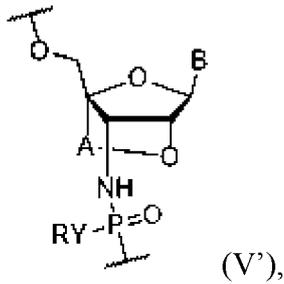
где Y представляет собой S или O, R представляет собой H или положительно заряженный противоион, B представляет собой нуклеиновое основание, R_2 представляет собой $-CR'_3$, $-CR'_2OCR'_3$, $-(CR'_2)_3OCR'_3$ или $-(CR'_2)_{1-2}CR'_3$, или R_2 представляет собой $-(CR'_2)_2OCR'_3$, и Y представляет собой O, и R' независимо в каждом случае представляет собой H или F. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере один нуклеотид формулы (II), где R_2 представляет собой $-CR'_3$. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере один нуклеотид формулы (II), где R_2 представляет собой $-(CR'_2)_{1-2}OCR'_3$. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере один нуклеотид формулы (II), где R_2 представляет собой $-(CR'_2)_{1-2}CR'_3$. В некоторых вариантах осуществления B представляет собой модифицированное нуклеиновое основание в по меньшей мере одном нуклеотиде формулы (II). В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой S в по меньшей мере одном нуклеотиде формулы (II). В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой O в по меньшей мере одном нуклеотиде формулы (II). В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой S в каждом нуклеотиде формулы (II). В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой O в каждом нуклеотиде формулы (II).

[0010] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид дополнительно содержит один или более нуклеотидов формулы (IIIa) или формулы (IIIb),



где Y представляет собой S или O, R представляет собой H или положительно заряженный противоион, B представляет собой нуклеиновое основание,

[0011] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид дополнительно содержит один или более нуклеотидов формулы (V'),

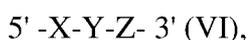


где Y представляет собой S или O, R представляет собой H или положительно заряженный противоион, B независимо в каждом случае представляет собой природное или немодифицированное нуклеиновое основание или модифицированное нуклеиновое основание, A представляет собой $-(CR''R'')_{1-2}$, и R'' независимо в каждом случае представляет собой H, F или Me.

[0012] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид расположен в конструкции формулы (VI), $5' X-Y-Z 3'$ (VI), где каждый из X, Y и Z представляет собой домен, содержащий 2-14 нуклеотидов, по меньшей мере один из доменов X и Z содержит по меньшей мере один нуклеотид формулы (I), и где каждый из нуклеотидов домена Y представляет собой 2'-дезоксинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит от 18 до 22 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления каждый из доменов X и Z содержит 5-10 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления домен Y содержит 5-10 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждый из доменов X и Z содержит 5-10 нуклеотидов, и домен Y содержит 5-10 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждый из доменов X и Z содержит 5 нуклеотидов, и домен Y содержит 10 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид доменов X и Z представляет собой нуклеотид формулы (I). В некоторых вариантах осуществления каждый из по меньшей мере одного нуклеотида домена X и по меньшей мере одного нуклеотида домена Z независимо выбран из группы, состоящей из нуклеотида формулы (II), нуклеотида формулы (IIIa) и нуклеотида формулы (IIIb). В некоторых вариантах осуществления каждый из по меньшей мере одного нуклеотида доменов X и Z является одним и тем же нуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид домена Y связан посредством тиофосфатных межсубъединичных связей. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является одонитевым. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид представляет собой антисмысловый олигонуклеотид.

[0013] В вариантах осуществления олигонуклеотид комплементарен по меньшей мере части экзона 5 гена MАРТ человека.

[0014] Другие варианты осуществления предусматривают химерный олигонуклеотид, содержащий последовательность, комплементарную по меньшей мере части последовательности гена MАРТ, где один или более нуклеотидов олигонуклеотида являются нуклеотидами формулы (VI),

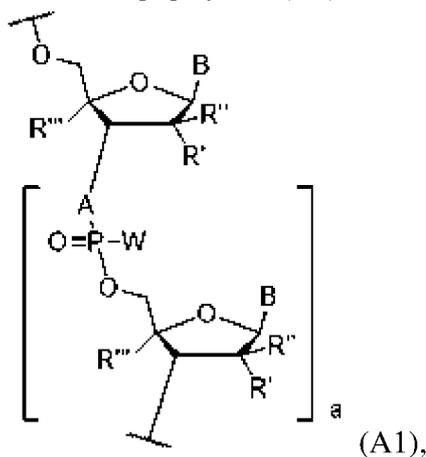


где X-Y-Z представляет собой химерный олигонуклеотид, содержащий

последовательность из 18-22 нуклеозидов и необязательно конъюгированный по 5'- и/или 3'-концу с лиганд-нацеленной группой; X представляет собой домен, содержащий последовательность модифицированных нуклеозидов длиной 3-10 нуклеозидов; Z представляет собой домен, содержащий последовательность модифицированных нуклеозидов длиной 3-10 нуклеозидов; и Y представляет собой домен, содержащий последовательность из 2-14 2'-дезоксинуклеозидов, связанных посредством тиофосфатных межсубъединичных связей. В некоторых вариантах осуществления длина домена Y составляет от 6 до 10 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления домены X и/или Z содержат последовательность модифицированных нуклеозидов, связанных посредством фосфорамидатных $N3' \rightarrow P5'$ или тиофосфорамидатных $N3' \rightarrow P5'$ межсубъединичных связей. В некоторых вариантах осуществления домен Y содержит по меньшей мере одну фосфодиэфирную межсубъединичную связь. В некоторых вариантах осуществления домен Y состоит из 2'-дезоксинуклеозидов, связанных посредством тиофосфатных межсубъединичных связей, и необязательно из одной или двух фосфодиэфирных межсубъединичных связей. В некоторых вариантах осуществления домен X содержит модифицированные нуклеозиды, где модификация независимо выбрана из группы, состоящей из 2'-F, 2'-F- $N3' \rightarrow P5'$, 2'-OMe, 2'-OMe- $N3' \rightarrow P5'$, 2'-O-метоксиэтокси, 2'-O-метоксиэтокси- $N3' \rightarrow P5'$, конформационно ограниченных нуклеозидов, тиофосфорамидата 2'-ОН- $N3' \rightarrow P5'$ и фосфорамидата 2'-ОН- $N3' \rightarrow P5'$. В некоторых вариантах осуществления функциональный домен Z содержит модифицированные нуклеозиды, где модификация выбрана из группы, состоящей из 2'-F, 2'-F- $N3' \rightarrow P5'$, 2'-OMe, 2'-OMe- $N3' \rightarrow P5'$, 2'-O-метоксиэтокси, 2'-O-метоксиэтокси- $N3' \rightarrow P5'$, конформационно ограниченных нуклеозидов, тиофосфорамидата 2'-ОН- $N3' \rightarrow P5'$ и фосфорамидата 2'-ОН- $N3' \rightarrow P5'$. В некоторых вариантах осуществления домены X и/или Z содержат один или более 2'-дезоксинуклеозидов, связанных посредством межсубъединичной фосфорамидатной связи $N3' \rightarrow P5'$. В некоторых вариантах осуществления домены X и Z содержат один или более 2'-арабино-F и/или 2'-рибо-F-модифицированных нуклеозидов, где каждый указанный нуклеозид независимо связан посредством по меньшей мере одной из фосфорамидатной $N3' \rightarrow P5'$ или тиофосфорамидатной $N3' \rightarrow P5'$ межсубъединичной связи. В некоторых вариантах осуществления домены X и Z содержат один или более 2'-OMe-модифицированных нуклеозидов, где каждый указанный нуклеозид независимо связан посредством по меньшей мере одной из фосфорамидатной $N3' \rightarrow P5'$, тиофосфорамидатной $N3' \rightarrow P5'$ или тиофосфатной межсубъединичных связей. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеозиды в каждом из доменов X и Z представляют собой 2'-OMe-модифицированные нуклеозиды, связанные посредством тиофосфатных межсубъединичных связей, и где модифицированные нуклеозиды включают 5-метилцитозинового нуклеинового основания, но необязательно не являющиеся цитозином. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеозиды включают 2,6-диаминопуриновые нуклеинового основания, но необязательно не являющиеся аденином.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеозиды включают 5-метилурациловые нуклеиновые основания, но необязательно не являющиеся урацилом. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеозиды включают 2,6-диаминопуриновые нуклеиновые основания, но не являющиеся аденином и 5-метилурациловые нуклеиновые основания, но необязательно не являющиеся урацилом. В некоторых вариантах осуществления домен Y содержит 6-8 2'-дезоксинуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеозиды в каждом из доменов X и Z предусматривают 2'-ОМе-модифицированные нуклеозиды и конформационно ограниченные нуклеозиды, необязательно связанные посредством тиофосфатных межсубъединичных связей, и где 2'-ОМе-модифицированные нуклеозиды включают 5-метилцитозиновые нуклеиновые основания, но необязательно не являющиеся цитозином. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеозиды в каждом из доменов X и Z предусматривают 2'-ОМе- и конформационно ограниченные нуклеозиды. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеозиды в каждом из доменов X и Z предусматривают конформационно ограниченные нуклеозиды, и при этом по меньшей мере один модифицированный нуклеозид включает фосфорамидатную $N3' \rightarrow P5'$ или тиофосфорамидатную $N3' \rightarrow P5'$ межсубъединичную связь. В некоторых вариантах осуществления домен Y содержит 7-8 2'-дезоксинуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления 2'-ОМе-модифицированные нуклеозиды включают 5-метилурациловые нуклеиновые основания, но необязательно не являющиеся урацилом. В некоторых вариантах осуществления домен Y содержит 9-10 2'-дезоксинуклеозидов.

[0015] В некоторых вариантах осуществления домены X и Z содержат нуклеотиды, представленное формулой (A1),



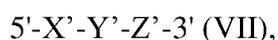
где A независимо в каждом случае представляет собой NH или O; B независимо в каждом случае представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание; W независимо в каждом случае представляет собой OR или SR, где R представляет собой H или положительно заряженный противоион; каждый из R' и R'' независимо в каждом случае выбран из группы, состоящей из H, F, Cl, OH, OMe, Me и O-метоксиэтокси; R''' представляет собой H, или R' и R''' вместе образуют -O-CH₂- или -

$O-(CH_2)_2-$, и a представляет собой целое число от 3 до 9, где в случае если каждый из R' , R'' и R''' представляет собой H, тогда A представляет собой NH, и необязательно в случае если A представляет собой O, тогда W представляет собой SR.

[0016] В некоторых вариантах осуществления лиганд-нацеленная группа выбрана из группы, состоящей из токоферолов, пальмитиновой кислоты и липоевой кислоты и их комбинаций.

[0017] В некоторых вариантах осуществления домен X и/или Z содержит один или более олигонуклеотидов, где модификация представляет собой 2'-O-метоксиэтокси- $N3' \rightarrow P5'$. В некоторых вариантах осуществления домен X содержит один или более олигонуклеотидов, где модификация представляет собой 2'-O-метоксиэтокси- $N3' \rightarrow P5'$. В некоторых вариантах осуществления домен Z содержит один или более олигонуклеотидов, где модификация представляет собой 2'-O-метоксиэтокси- $N3' \rightarrow P5'$. В некоторых вариантах осуществления конструкция указанного олигонуклеотида соответствует конструкции из таблицы B

[0018] Другие варианты осуществления предусматривают химерный олигонуклеотид, содержащий последовательность, комплементарную по меньшей мере части последовательности гена MАРТ, где один или более нуклеотидов олигонуклеотида являются нуклеотидами формулы (VII),

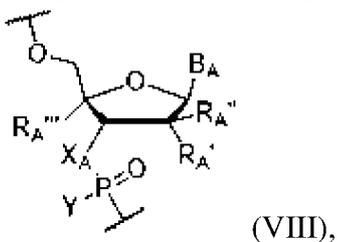


где $X'-Y'-Z'$ представляет собой химерный олигонуклеотид, содержащий последовательность из 16-22 нуклеозидов и необязательно конъюгированный по 5'- и/или 3'-концу; X' представляет собой домен, содержащий последовательность модифицированных нуклеозидов длиной 3-10 нуклеозидов; Z' представляет собой домен, содержащий последовательность модифицированных нуклеозидов длиной 3-10 нуклеозидов; и Y' представляет собой домен, содержащий последовательность из 2-4 2'-дезоксинуклеозидов, связанных посредством межсубъединичных связей, где домены X' и/или Z' содержат последовательность модифицированных нуклеозидов, связанных посредством фосфорамидатной $N3' \rightarrow P5'$ или тиофосфорамидатной $N3' \rightarrow P5'$ межсубъединичных связей. В некоторых вариантах осуществления домен Y' состоит из 2'-дезоксинуклеозидов, связанных посредством тиофосфатных межсубъединичных связей, и необязательно одной фосфодизфирной межсубъединичной связи. В некоторых вариантах осуществления длина домена X' составляет 9 или 10 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления домен X' содержит модифицированные нуклеозиды, где модификация независимо выбрана из группы, состоящей из 2'-F, 2'-F- $N3' \rightarrow P5'$, 2'-OMe, 2'-OMe- $N3' \rightarrow P5'$, 2'-O-метоксиэтокси, 2'-O-метоксиэтокси- $N3' \rightarrow P5'$ и конформационно ограниченных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления домен Z' содержит модифицированные нуклеозиды, где модификация выбрана из группы, состоящей из 2'-F, 2'-F- $N3' \rightarrow P5'$, 2'-ОН, 2'-OMe, 2'-OMe- $N3' \rightarrow P5'$, 2'-O-метоксиэтокси, 2'-O-метоксиэтокси- $N3' \rightarrow P5'$ и конформационно ограниченных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления домены X' и/или Z' содержат один или более 2'-арабино-F

и/или 2'-рибо-*F*-модифицированных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеозиды в доменах X' и Z' предусматривают 2'-ОМе- и/или конформационно ограниченные нуклеозиды. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеозиды в доменах X' и/или Z' предусматривают конформационно ограниченные нуклеозиды и модификацию $N3' \rightarrow P5'$. В некоторых вариантах осуществления последовательность выбрана из последовательностей в таблице В, имеющих домен Y из 2-4 нуклеотидов.

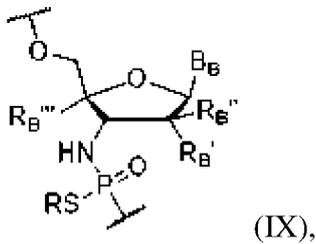
[0019] Другие варианты осуществления предусматривают химерный олигонуклеотид, содержащий последовательность, комплементарную по меньшей мере части последовательности гена *MART*, где последовательность нуклеиновых оснований олигонуклеотида соответствует последовательности, указанной в таблице D.

[0020] Другие варианты осуществления предусматривают олигонуклеотид, содержащий последовательность, комплементарную по меньшей мере части последовательности гена *MART*, где один или более нуклеотидов олигонуклеотида являются нуклеотидами следующей формулы (VIII),



где X_A представляет собой NH или O, Y представляет собой OR или SR, где R представляет собой H или положительно заряженный противоион, B_A независимо в каждом случае представляет собой природное или немодифицированное нуклеиновое основание или модифицированное нуклеиновое основание, каждый из R_A' и R_A'' независимо в каждом случае выбран из H, F, OH, OMe, Me, O-метоксиэтокси, и R_A''' представляет собой H, или R_A' и R_A''' вместе образуют $-O-CH_2-$ или $-O-(CH_2)_2-$. В некоторых вариантах осуществления R_A' и R_A''' представляют собой H; и R_A'' представляет собой F. В некоторых вариантах осуществления R_A' и R_A'' представляют собой H; и R_A''' представляет собой F, OH, H или OMe. В некоторых вариантах осуществления X_A представляет собой NH; B_A представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание; R_A' и R_A''' вместе образуют конформационно ограниченный нуклеозид (например, $-O-CH_2-$ или $-O-(CH_2)_2-$); и R_A'' представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из R_A' и R_A'' представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления, в случае если B_A представляет собой пуриновое нуклеиновое основание, по меньшей мере один из R_A' и R_A'' представляет собой OH или F, и/или в случае если B_A представляет собой пиримидиновое нуклеиновое основание, по меньшей мере один из R_A' и R_A'' представляет собой OMe, OH или F. В некоторых вариантах осуществления модифицированное нуклеиновое основание выбрано из 5-метилцитозина, 2,6-диаминопурина, 5-метилурацила и *g*-фиксирующего основания.

[0021] Другие варианты осуществления предусматривают олигонуклеотид, содержащий последовательность, комплементарную по меньшей мере части последовательности гена МАРТ, где десять или больше нуклеотидов олигонуклеотида являются нуклеотидами следующей формулы (IX),



где R представляет собой H или положительно заряженный противоион, B_V независимо в каждом случае представляет собой природное или немодифицированное нуклеиновое основание или модифицированное нуклеиновое основание, каждый из $R_{B'}$ и $R_{B''}$ независимо в каждом случае выбран из H, F, OMe, Me, O-метоксиэтокси, и $R_{B'''}$ представляет собой H, или $R_{B'}$ и $R_{B'''}$ вместе образуют $-O-CH_2-$ или $-O-(CH_2)_2-$. В некоторых вариантах осуществления $R_{B'}$ и $R_{B'''}$ представляют собой H; и $R_{B''}$ представляет собой F. В некоторых вариантах осуществления $R_{B'}$ и $R_{B''}$ представляют собой H; и $R_{B'''}$ представляет собой F, OH, H или OMe. В некоторых вариантах осуществления B_V представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание; $R_{B'}$ и $R_{B'''}$ вместе образуют конформационно ограниченный нуклеозид (например, $-O-CH_2-$ или $-O-(CH_2)_2-$); и $R_{B''}$ представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из $R_{B'}$ и $R_{B''}$ представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления, в случае если B_V представляет собой пуриновое нуклеиновое основание, по меньшей мере один из $R_{B'}$ и $R_{B''}$ представляет собой OH или F, и/или в случае если B_V представляет собой пиримидиновое нуклеиновое основание, по меньшей мере один из $R_{B'}$ и $R_{B''}$ представляет собой OMe, OH или F. В некоторых вариантах осуществления модифицированное нуклеиновое основание выбрано из 5-метилцитозина, 2,6-диаминопурина, 5-метилурацила и g-фиксирующего основания.

[0022] В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды формулы (B) включают нуклеотиды из таблицы A, где X_A представляет собой NH. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид формулы (B) расположен и модифицирован в соответствии с конструкциями, перечисленными в таблице B. В некоторых вариантах осуществления конструкция формулы (B) включает последовательность из 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеиновых оснований, отличных от последовательности, выбранной из последовательностей в таблице D. В некоторых вариантах осуществления каждый олигонуклеотид является нуклеотидом формулы (B).

[0023] В вариантах осуществления последовательность нуклеиновых оснований олигонуклеотида соответствует SEQ ID NO: 1. В вариантах осуществления последовательность под SEQ ID NO: 1 модифицирована в соответствии с по меньшей мере одной из раскрытых модификаций. В вариантах осуществления по меньшей мере первые два нуклеотида с 5'- и 3'-концов олигонуклеотида, имеющие последовательность

нуклеиновых оснований, соответствующую SEQ ID NO: 1, модифицированы для включения фосфорамидатной связи и дополнительно модифицированы для включения модификации 2'-метоксиэтокси (2'МОЕ). В вариантах осуществления по меньшей мере первые три нуклеотида с 5'- и 3'-концов олигонуклеотида, имеющие последовательность нуклеиновых оснований, соответствующую SEQ ID NO: 1, дополнительно модифицированы для включения модификации 2'МОЕ. В вариантах осуществления по меньшей мере первые четыре нуклеотида с 5'- и 3'-концов олигонуклеотида, имеющие последовательность нуклеиновых оснований, соответствующую SEQ ID NO: 1, дополнительно модифицированы для включения модификации 2'МОЕ. В вариантах осуществления по меньшей мере первые пять нуклеотидов с 5'- и 3'-концов олигонуклеотида, имеющие последовательность нуклеиновых оснований, соответствующую SEQ ID NO: 1, дополнительно модифицированы для включения модификации 2'МОЕ. В вариантах осуществления по меньшей мере первые шесть нуклеотидов с 5'- и 3'-концов олигонуклеотида, имеющие последовательность нуклеиновых оснований, соответствующую SEQ ID NO: 1, дополнительно модифицированы для включения модификации 2'МОЕ.

[0024] Другие варианты осуществления предусматривают фармацевтическую композицию, содержащую олигонуклеотид согласно любому из предыдущих вариантов осуществления и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления композиция является подходящей для интратекальной или интрацеребровентрикулярной доставки. Другие варианты осуществления предусматривают способ подавления экспрессии гена МАРТ в клетке центральной нервной системы (ЦНС), такой как нейрон, астроцит, олигодендроцит и микроглия, включающий приведение клетки в контакт с олигонуклеотидом или композицией согласно любому из предыдущих вариантов осуществления. Другие варианты осуществления предусматривают способ подавления транскрипции или трансляции МАРТ в клетке ЦНС, включающий приведение клетки в контакт с олигонуклеотидом или композицией согласно любому из предыдущих вариантов осуществления. Другие варианты осуществления предусматривают способ лечения субъекта, у которого имеется таупатия, такая как болезнь Альцгеймера (AD) и/или любое связанное с таупатией нарушение, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества олигонуклеотида или композиции согласно любому из предыдущих вариантов осуществления. Другие варианты осуществления предусматривают олигонуклеотид согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где указанный олигонуклеотид, образующий комплекс с по меньшей мере частью последовательности гена МАРТ, имеет температуру плавления (T_m) $> 37^\circ\text{C}$. Другие варианты осуществления предусматривают способ лечения субъекта, у которого имеется таупатия, такая как болезнь Альцгеймера (AD) и/или любое связанное с таупатией нарушение, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества олигонуклеотида или композиции согласно любому из предыдущих вариантов осуществления. Другие варианты

осуществления предусматривают способ подавления экспрессии целевой РНК в клетке ЦНС, включающий приведение клетки в контакт с олигонуклеотидом или композицией, содержащими указанный олигонуклеотид согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где химерный олигонуклеотид содержит последовательность нуклеиновых оснований, которая комплементарна части целевой РНК или гибридизируется с ней. Другие варианты осуществления предусматривают способ подавления транскрипции или трансляции гена МАРТ в клетке ЦНС, включающий приведение клетки в контакт с олигонуклеотидом или композицией, содержащими указанный олигонуклеотид согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом указанный содержащийся олигонуклеотид содержит последовательность нуклеиновых оснований, которая комплементарна по меньшей мере части гена МАРТ или гибридизируется с ней. Другие варианты осуществления предусматривают способ лечения субъекта, у которого имеется таупатия, такая как болезнь Альцгеймера (AD) и/или любое нарушение, связанное с таупатией, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества олигонуклеотида или композиции, содержащей указанный олигонуклеотид согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где олигонуклеотид содержит последовательность нуклеиновых оснований, которая комплементарна по меньшей мере части гена МАРТ или гибридизируется с ней. Другие варианты осуществления предусматривают способ модулирования экспрессии мишени путем приведения в контакт целевой нуклеиновой кислоты с антисмысловым соединением, содержащим олигонуклеотид, или композицией, содержащей указанный олигонуклеотид согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где олигонуклеотид содержит последовательность нуклеиновых оснований, которая комплементарна или части целевой нуклеиновой кислоты или гибридизируется с ней.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0025] Настоящее изобретение направлено на олигонуклеотиды, содержащие последовательность, комплементарную по меньшей мере части последовательности гена МАРТ, где один или более нуклеотидов олигонуклеотида являются модифицированными нуклеотидами, и два или более нуклеотидов содержат модифицированные связи между нуклеотидами. Настоящее изобретение также направлено на конструкции олигонуклеотидов, которые включают домены, области или части в олигонуклеотиде, имеющие общие признаки, и дополнительные компоненты, конъюгированные с олигонуклеотидом, такие как нацеливающие фрагменты. Настоящее изобретение дополнительно направлено на способы применения и получения олигонуклеотидов и их конструкций.

[0026] Как известно из уровня техники и как изложено в настоящем изобретении, модифицированный нуклеотид представляет собой любой нуклеотид, который не является дезоксирибонуклеотидом. Например, 2'-атом углерода дезоксирибозы может быть замещен заместителем, отличным от гидроксильной (ОН); 3'-атом углерода дезоксирибозы может быть замещен заместителем, отличным от атома кислорода (О). Как известно из

уровня техники и как изложено в настоящем изобретении, модифицированная связь между двумя нуклеотидами представляет собой любую связь, которая не является фосфодиэфирной связью между 3'-атомом углерода дезоксирибозы первого нуклеотида и 5'-атомом углерода дезоксирибозы второго нуклеотида.

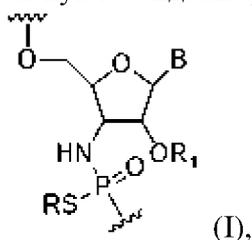
1. 2', 3'-Модифицированные нуклеотиды и родственные олигонуклеотиды

[0027] Соединения по настоящему изобретению включают олигонуклеотиды, содержащие последовательность, комплементарную по меньшей мере части последовательности гена MART, где один или более нуклеотидов олигонуклеотида представляют собой модифицированные нуклеотиды с определенными 2'- и 3'-модификациями. В вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению предусматривают замену гидроксильной группы или замещение по 2'-атому углерода дезоксирибозного сахара. Кроме того, эти соединения по настоящему изобретению предусматривают модификации связи между двумя нуклеозидами, что предусматривает замену атома кислорода или замещение атомом азота (N) по 3'-атому углерода дезоксирибозного сахара. Модификации связи дополнительно включают замену другого атома кислорода или замещение в фосфодиэфирной связи.

[0028] Эти модифицированные нуклеотиды могут использоваться, например, в олигонуклеотидах, таких как химерные олигонуклеотиды, обеспечивающие ферментативное расщепление генетической мишени РНКазой H или модифицированными антисмысловыми олигонуклеотидами.

2', 3'-Модифицированные нуклеотиды

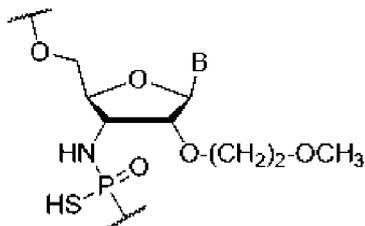
[0029] Соответственно, соединения по настоящему изобретению включают олигонуклеотиды, содержащие последовательность, комплементарную по меньшей мере части последовательности гена MART, где один или более нуклеотидов олигонуклеотидов являются нуклеотидами формулы (I),



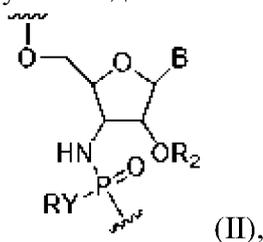
где R представляет собой H или положительно заряженный противоион, B независимо в каждом случае представляет собой природное или немодифицированное нуклеиновое основание или модифицированное нуклеиновое основание, R₁ представляет собой -(CR'₂)₂OCR'₃, и R' независимо в каждом случае представляет собой H или F.

[0030] В нуклеотидах формулы (I), R₁ представляет собой -(CR'₂)₂OCR'₃. В некоторых вариантах осуществления R' представляет собой H в каждом случае. В других вариантах осуществления по меньшей мере один R' представляет собой F, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 R' представляют собой F. В некоторых вариантах осуществления CR'₃ содержит 1, 2 или 3 F-фрагмента. Например, в вариантах осуществления R₁ выбран из группы, состоящей из -CH₂CH₂OCH₃ (или MOE), -CF₂CH₂OCH₃, -CH₂CF₂OCH₃, -

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCF}_3$, $-\text{CF}_2\text{CF}_2\text{OCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CF}_2\text{OCF}_3$, $-\text{CF}_2\text{CH}_2\text{OCF}_3$, $-\text{CF}_2\text{CF}_2\text{OCF}_3$, $-\text{CHFCH}_2\text{OCH}_3$, $-\text{CHFCHFOCH}_3$, $-\text{CHFCH}_2\text{OCFH}_2$, $-\text{CHFCH}_2\text{OCHF}_2$ и $-\text{CH}_2\text{CHFCH}_3$. В вариантах осуществления нуклеотид формулы I представляет собой:



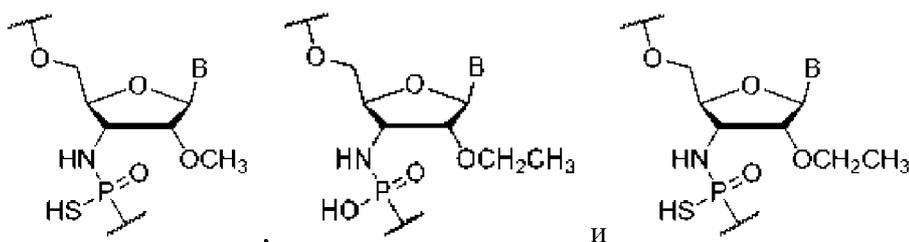
[0031] В вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению включают олигонуклеотиды, содержащие последовательность, комплементарную по меньшей мере части последовательности гена МАРТ, где один или более нуклеотидов олигонуклеотидов являются нуклеотидами формулы (II),



где Y представляет собой S или O, R представляет собой H или положительно заряженный противоион, B представляет собой нуклеиновое основание, R₂ представляет собой $-\text{CR}'_3$, $-\text{CR}'_2\text{OCR}'_3$, $-(\text{CR}'_2)_3\text{OCR}'_3$ или $-(\text{CR}'_2)_{1-2}\text{CR}'_3$, или R₂ представляет собой $-(\text{CR}'_2)_2\text{OCR}'_3$, и Y представляет собой O, и R' независимо в каждом случае представляет собой H или F.

[0032] В нуклеотиде формулы (II) R₂ представляет собой $-\text{CR}'_3$, $-(\text{CR}'_2)_{1-3}\text{OCR}'_3$ или $-(\text{CR}'_2)_{1-2}\text{CR}'_3$. В некоторых вариантах осуществления R₂ представляет собой $-\text{CR}'_3$ или $-\text{CR}'_2\text{CR}'_3$. В некоторых вариантах осуществления R' представляет собой H в каждом случае. В других вариантах осуществления по меньшей мере один R' представляет собой F, например, 1, 2, 3, 4 или 5 R' представляют собой F. В некоторых вариантах осуществления CR'₃ содержит 1, 2 или 3 F-фрагмента. Например, в вариантах осуществления R₂ выбран из группы, состоящей из $-\text{CH}_3$ (или Me), $-\text{CFH}_2$, $-\text{CHF}_2$, CF_3 , $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$, $-\text{CFH}_2\text{OCH}_3$, $-\text{CHF}_2\text{OCH}_3$, $-\text{CF}_3\text{OCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OCFH}_2$, $-\text{CH}_2\text{OCHF}_2$, $-\text{CH}_2\text{OCF}_3$, $-\text{CFH}_2\text{OCH}_3$, $-\text{CFH}_2\text{OCFH}_2$, $-\text{CFH}_2\text{OCHF}_2$, $-\text{CFH}_2\text{OCF}_3$, $-\text{CHF}_2\text{OCH}_3$, $-\text{CHF}_2\text{OCFH}_2$, $-\text{CHF}_2\text{OCHF}_2$, $-\text{CHF}_2\text{OCF}_3$, $-(\text{CR}'_2)_3\text{OCR}'_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ (или Et), $-\text{CFH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CHF}_2\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CFH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CHF}_2$, $-\text{CH}_2\text{CF}_3$, $-\text{CFH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CFH}_2\text{CFH}_2$, $-\text{CFH}_2\text{CHF}_2$, $-\text{CFH}_2\text{CF}_3$, $-\text{CHF}_2\text{CH}_3$, $-\text{CHF}_2\text{CFH}_2$, $-\text{CHF}_2\text{CHF}_2$, $-\text{CHF}_2\text{CF}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{CF}_2\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$, $\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CH}_3$, $\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$, $\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3$, $\text{CHFCH}_2\text{CH}_3$, CHFCHFOCH_3 , $\text{CHFCH}_2\text{CFH}_2$, $\text{CHFCH}_2\text{CHF}_2$ и $\text{CH}_2\text{CHFCH}_3$. В вариантах осуществления R₂ представляет собой $-\text{CH}_3$ (или Me) или $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ (или Et).

[0033] В вариантах осуществления нуклеотиды формулы II выбраны из группы, состоящей из

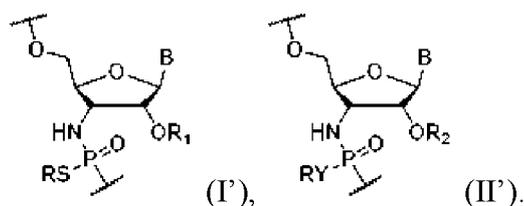


[0034] В соединениях формул (I) или (II) Y может представлять собой O или S. В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой S в по меньшей мере одном случае (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 и т. д.). В других вариантах осуществления Y представляет собой S в по меньшей мере одном случае и O в по меньшей мере другом случае. В других вариантах осуществления Y представляет собой S в каждом случае. В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой O в по меньшей мере одном случае (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 и т. д.).

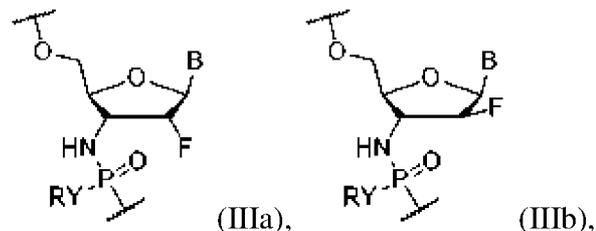
[0035] Раскрытые олигонуклеотиды содержат по меньшей мере один нуклеотид формулы (I). В вариантах осуществления раскрытые олигонуклеотиды содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 нуклеотида формулы (I). В вариантах осуществления раскрытые олигонуклеотиды содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 нуклеотида формулы (II). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит нуклеотиды в количестве от 2 до 40, например в количестве от 8 до 26, или в количестве, которое равняется целому числу между ними.

[0036] В вариантах осуществления, где более чем один нуклеотид формулы (I) включен в олигонуклеотид, нуклеотид может быть таким же или отличающимся. В некоторых вариантах осуществления включены один или более нуклеотидов формулы (II), которые могут быть такими же или разными. Например, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере один нуклеотид формулы (I) и по меньшей мере один нуклеотид формулы (II). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере один нуклеотид формулы (I), где по меньшей мере один R₁ представляет собой МОЕ, и по меньшей мере один нуклеотид формулы (II), где R₂ представляет собой Me или Et. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере 2 чередующихся нуклеотида формулы (I) и формулы (II). Например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 нуклеотида с чередующейся 2'-модификацией (например, Me-МОЕ-Me-МОЕ... или Et-МОЕ-Et-МОЕ-Et-МОЕ...).

[0037] В некоторых вариантах осуществления нуклеотид формулы (I) и/или формулы (II) представлен следующими:



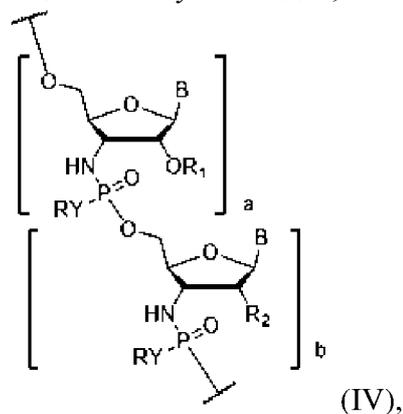
[0038] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, содержащий нуклеотид формулы (I), дополнительно содержит 2'-фторнуклеотид формулы (IIIa) и/или (IIIb),



где Y представляет собой S или O, R представляет собой H или положительно заряженный противоион, B представляет собой нуклеиновое основание,

[0039] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере 4 чередующихся нуклеотида формул (I) и (IIIa). Например, олигонуклеотид содержит 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 чередующихся нуклеотида.

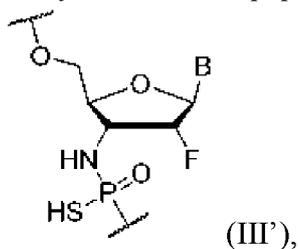
[0040] Определенные варианты осуществления предусматривают олигонуклеотид, содержащий 4-40 нуклеотидов, и характеризующийся формулой (IV),



где Y представляет собой S или O, R представляет собой H или положительно заряженный противоион, B представляет собой нуклеиновое основание, R_1 представляет собой $-(CR'_2)_2OCR'_3$, R_2 выбран из $-OCR'_3$, $-OCR'_2OCR'_3$, $-O(CR'_2)_3OCR'_3$ или $-O(CR'_2)_{1-2}CR'_3$ и F, R' независимо в каждом случае представляет собой H или F, и a представляет собой целое число, составляющее 1-10, и b представляет собой целое число, составляющее 1-10, в некоторых случаях до 20, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20.

[0041] Соединения по настоящему изобретению включают олигонуклеотиды, содержащие последовательность, комплементарную по меньшей мере части последовательности гена MАРТ, где один или более нуклеотидов олигонуклеотидов

являются нуклеотидами формулы (III'),



где Y представляет собой S или O, R представляет собой H или положительно заряженный противоион, и B независимо в каждом случае представляет собой природное или немодифицированное нуклеиновое основание или модифицированное нуклеиновое основание; и необязательно характеризующиеся одной или более формулами (I), (II) и/или (IV).

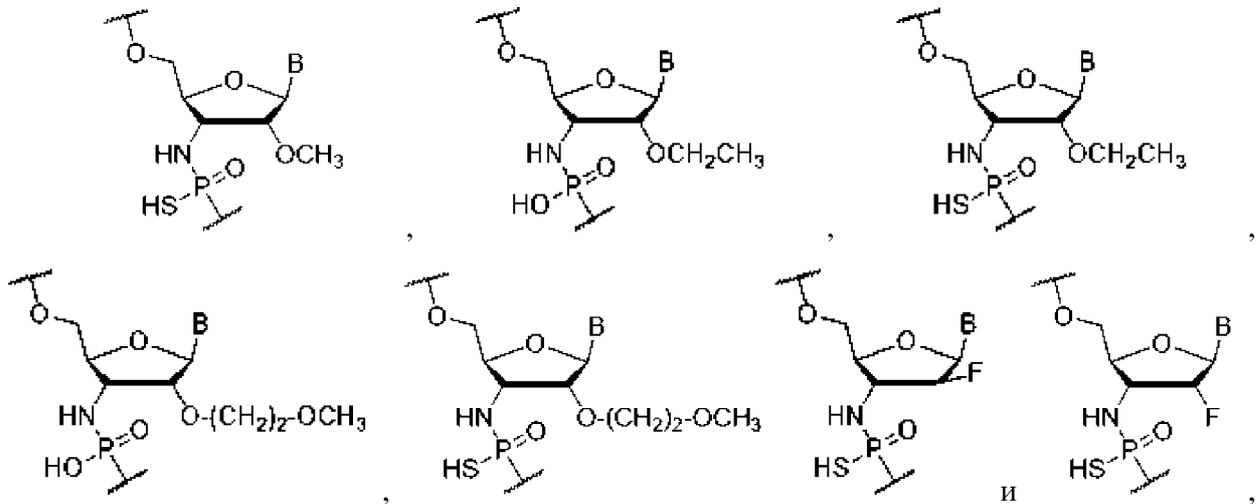
[0042] Каждое из нуклеотидных оснований B нуклеотидов формул (I), (II), (IIIa), (IIIb), (IV) и (V) может независимо представлять собой природное или немодифицированное нуклеиновое основание или модифицированное нуклеиновое основание. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды включают 2,6-диаминопуриновые нуклеиновые основания, но необязательно не являющиеся аденином. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды включают 5-метилурациловые нуклеиновые основания, но необязательно не являющиеся урацилом. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды включают 2,6-диаминопуриновые нуклеиновые основания, но не являющиеся аденином и 5-метилурациловые нуклеиновые основания, но необязательно не являющиеся урацилом.

[0043] Y в каждом нуклеотиде формул (II), (IIIa), (IIIb), (IV) и (V) может независимо представлять собой O или S. В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой S в по меньшей мере одном случае (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 и т. д.). В других вариантах осуществления Y представляет собой S в по меньшей мере одном случае и O в по меньшей мере другом случае. В других вариантах осуществления Y представляет собой S в каждом случае. В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой O в по меньшей мере одном случае (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 и т. д.).

[0044] В вариантах осуществления, где предусмотрен более чем один нуклеотид каждой из формул (I), (II), (IIIa), (IIIb), (IV) и (V), более чем один нуклеотид таких формул может быть таким же или отличающимся. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеотид предусматривает по меньшей мере один нуклеотид формулы (II), (III), (IV), (V) и/или (V') в дополнение к по меньшей мере одному нуклеотиду формулы (I). В некоторых вариантах осуществления нуклеотид предусматривает по меньшей мере 2 чередующихся нуклеотида формулы (I), и/или формулы (II), и/или (III), и/или (IV), (V) и/или (V'). Например, раскрытые олигонуклеотиды могут включать 2, 3, 4,

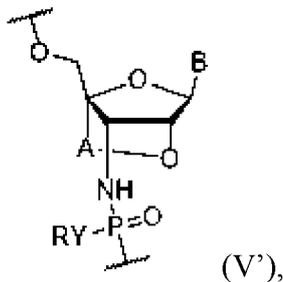
5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 нуклеотида с чередующимися 2'-модификациями.

[0045] В вариантах осуществления нуклеотиды олигонуклеотида выбраны из группы, состоящей из



где В может представлять собой любое природное или модифицированное основание.

[0046] Соединения по настоящему изобретению включают олигонуклеотиды, содержащие последовательность, комплементарную по меньшей мере части последовательности гена MART, где один или более нуклеотидов олигонуклеотидов являются нуклеотидами формулы (V'),



где Y представляет собой S или O, R представляет собой H или положительно заряженный противоион, В независимо в каждом случае представляет собой природное или немодифицированное нуклеиновое основание или модифицированное нуклеиновое основание, А представляет собой $-(CR''R'')_{1-2}$, и R'' независимо в каждом случае представляет собой H, F или Me, и необязательно характеризующиеся одной или более формулами (I), (II), (III), (IV) или (V).

[0047] В соединении, характеризующемся формулой (V'), А представляет собой $-(CR''R'')_{1-2}$. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой $-(CR''R'')$, в других вариантах осуществления А представляет собой $-(CR''R'')_2$. R'' независимо в каждом случае представляет собой H или Me. В некоторых вариантах осуществления один R'' представляет собой Me и остальные представляют собой H. В других вариантах осуществления все R'' представляют собой H.

[0048] В некоторых вариантах осуществления в случае если А представляет собой CH_2 , то Y представляет собой S. В других вариантах осуществления в случае если А

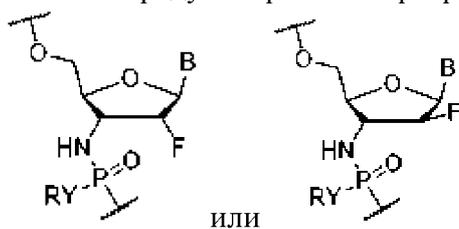
представляет собой CH_2CH_2 , то Y представляет собой O или S. В некоторых вариантах осуществления A представляет собой $\text{CH}_2\text{CH}(\text{Me})$ или $\text{CH}(\text{Me})$, и Y представляет собой O или S.

[0049] В соединении, характеризующемся формулой (V'), Y представляет собой O или S. В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой S в по меньшей мере одном случае (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 и т. д.). В других вариантах осуществления Y представляет собой S в по меньшей мере одном случае и O в по меньшей мере другом случае. В других вариантах осуществления Y представляет собой S в каждом случае. В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой O в по меньшей мере одном случае (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 и т. д.).

[0050] Соединение формулы (V') (и необязательно формул (I), (II), (III), (IV), (V) и/или (V')) может быть частью олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления соединение, характеризующееся формулой (IV) (и необязательно формулами (I), (II), (III), (IV), (V) и/или (V')), представляет собой олигонуклеотид, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 нуклеотида формулы (V') (и формул (I), (II), (III), (IV), (V) и/или (V')). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит нуклеотиды в количестве от 2 до 40, например в количестве от 8 до 26 или в количестве, которое равняется целому числу между ними.

[0051] В вариантах осуществления, где включен более чем один нуклеотид формулы (V'), более чем один нуклеотид формулы (V') может быть таким же или отличающимся. В некоторых вариантах осуществления включен один или более нуклеотидов формул (I), (II), (III), (IV), (V) и/или (V'), и при этом они могут быть такими же или разными. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеотид предусматривает по меньшей мере один нуклеотид формулы (V') и по меньшей мере один нуклеотид формул (I), (II), (III), (IV), (V) и/или (V'). В некоторых вариантах осуществления нуклеотид предусматривает по меньшей мере 2 чередующихся нуклеотида формулы (V') и формулы (I) и/или (II). Например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 нуклеотида с чередующимися 2'-модификациями.

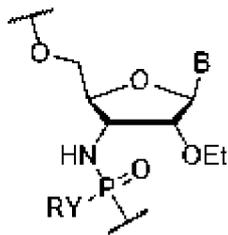
[0052] В некоторых вариантах осуществления нуклеотид, предусматривающий нуклеотид формулы (V') (и необязательно формул (I), (II), (III), (IV), (V) и/или (V')), дополнительно предусматривает 2-фторнуклеотид следующих структур



, где Y, R и B являются такими же как в формуле

(I). В некоторых вариантах осуществления нуклеотид предусматривает по меньшей мере 4 чередующихся нуклеотида формулы (V') и 2-фторнуклеотида.

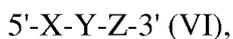
[0053] Соединения по настоящему изобретению включают олигонуклеотиды, содержащие последовательность, комплементарную по меньшей мере части последовательности гена МАРТ, где один или более нуклеотидов олигонуклеотидов являются нуклеотидами формулы (V),



где Y представляет собой S или O, R представляет собой H или положительно заряженный противоион, и B независимо в каждом случае представляет собой природное или немодифицированное нуклеиновое основание или модифицированное нуклеиновое основание; и необязательно характеризующиеся одной или более формулами (I), (II), (III), (IV) и/или (V').

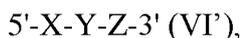
Химерные олигонуклеотиды

[0054] Настоящее изобретение направлено на конструкции олигонуклеотидов, содержащие последовательность, комплементарную по меньшей мере части последовательности гена МАРТ, которые включают домены, области или части в олигонуклеотиде, имеющие общие признаки. Олигонуклеотиды, содержащие эти домены, называются в данном документе химерными олигонуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления химерные олигонуклеотиды представлены формулой (VI),



где химерный олигонуклеотид содержит последовательность из 14-22 нуклеозидов, где X представляет собой домен, содержащий последовательность модифицированных нуклеотидов длиной 3-10 нуклеотидов; Z представляет собой домен, содержащий последовательность модифицированных нуклеотидов длиной 3-10 нуклеозидов; и Y представляет собой домен, содержащий последовательность из 2-10 2'-дезоксинуклеотидов или немодифицированных нуклеотидов. Каждый из нуклеозидов в каждом из доменов связан посредством межсубъединичных связей.

[0055] В некоторых вариантах осуществления химерные олигонуклеотиды, содержащие последовательность, комплементарную по меньшей мере части последовательности гена МАРТ, включают один или более нуклеотидов формулы (VI'),



где химерный олигонуклеотид содержит последовательность из 14-22 нуклеозидов, где X представляет собой домен, содержащий последовательность модифицированных нуклеотидов длиной 2-10 нуклеотидов; Z представляет собой домен, содержащий последовательность модифицированных нуклеотидов длиной 2-10 нуклеозидов; и Y представляет собой домен, содержащий последовательность из 6-14 2'-дезоксинуклеотидов или немодифицированных нуклеотидов. Каждый из нуклеозидов в

каждом из доменов связан посредством межсубъединичных связей.

[0056] Нуклеотиды формул (I), (II), (IIIa), (IIIb), (IV), (V) и/или (V') могут присутствовать в домене X и/или Z. Химерный олигонуклеотид может быть конъюгированным по 5'- и/или 3'- концу лиганд-нацеленной группы.

[0057] В некоторых вариантах осуществления домен Y содержит 2'-дезоксинуклеозиды, связанные посредством тиофосфатных межсубъединичных связей. В вариантах осуществления домен Y содержит 2'-дезоксинуклеозиды, связанные с помощью по меньшей мере одной фосфодиэфирной межсубъединичной связи. В вариантах осуществления домен Y содержит 2'-дезоксинуклеозиды, связанные с помощью двух фосфодиэфирных межсубъединичных связей. В вариантах осуществления домен Y содержит 2'-дезоксинуклеозиды, связанные с помощью тиофосфатных межсубъединичных связей и одной или двух фосфодиэфирных межсубъединичных связей. В некоторых вариантах осуществления длина домена Y составляет от 6 до 10 нуклеотидов.

[0058] В некоторых вариантах осуществления домен X содержит нуклеотиды формул (I), (II), (IIIa), (IIIb), (IV), (V) и/или (V'). В некоторых вариантах осуществления домен X содержит модифицированные нуклеотиды, где модификация независимо выбрана из 2'-ОМе, 2' -OEt, 2'-O-метоксиэтокси и конформационно ограниченных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина домена X составляет 9 или 10 нуклеотидов.

[0059] В некоторых вариантах осуществления домен Z содержит нуклеотиды формул (I), (II), (IIIa), (IIIb), (IV), (V) и/или (V'). В некоторых вариантах осуществления домен Z содержит 2'-модифицированные нуклеотиды, где модификация представляет собой 2'-ОМе, 2'-OEt или 2'-МОЕ. В некоторых вариантах осуществления длина домена Z составляет 9 или 10 нуклеотидов.

[0060] В вариантах осуществления химерный олигонуклеотид содержит последовательность из 14-22 нуклеотидов. Например, олигонуклеотид может включать 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 нуклеотида.

[0061] В вариантах осуществления X представляет собой домен, состоящий из последовательности, содержащей один или более модифицированных нуклеотидов, длина которой составляет 3-10 нуклеотидов; Z представляет собой домен, состоящий из последовательности, содержащей один или более модифицированных нуклеотидов, длина которой составляет 3-10 нуклеотидов; и Y представляет собой домен, состоящий из последовательности от 2 до 10 2'-дезоксинуклеозидов, связанных посредством тиофосфатных межсубъединичных связей и необязательно одной или двух фосфодиэфирных межсубъединичных связей. В некоторых вариантах осуществления длина X составляет 5-9, длина Y составляет 6-10 и длина Z составляет 5-9 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления число нуклеотидов в каждом из X, Y и Z соответственно составляет: 6/6/6, 6/6/7, 6/6/8, 6/7/6, 6/7/7, 6/7/8, 6/8/6, 6/8/7, 6/8/8, 3/10/3, 4/10/4, 5/10/5, 5/10/6, 2/12/2, 3/12/3, 2/14/2, 5/9/5, 5/9/6, 5/8/5, 5/8/6, 5/8/7, 7/5/7, 7/5/8,

7/5/9, 7/6/6, 7/6/7, 7/6/8, 7/6/9, 7/7/6, 7/7/7, 7/7/8, 7/7/9, 7/5/7, 7/5/8, 7/5/9, 7/4/7, 7/4/8, 7/4/9, 8/4/7, 8/4/8, 8/4/9, 7/3/7, 7/3/8, 7/3/9, 8/3/7, 8/3/8, 8/3/9, 8/3/10, 9/3/7, 9/3/8, 9/3/9, 9/3/10, 8/2/7, 8/2/8, 8/2/9, 8/2/10, 9/2/7, 9/2/8, 9/2/9, 9/2/10, 10/2/8, 10/2/9, 10/2/10. Каждый из доменов X и Z соответственно содержит последовательность из модифицированных нуклеотидов, где длина домена составляет 4-10 нуклеотидов. Например, домен X и/или домен Z могут содержать последовательность из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов. Один или более из таких нуклеотидов модифицированы (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10). Например, в некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды в каждом из домена X и/или домена Z модифицированы.

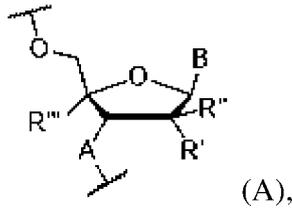
[0062] Нуклеотиды доменов X и Z могут быть модифицированы в соответствии с формулами (I), (II), (IIIa), (IIIb), (IV), (V) и/или (V') в отношении одного или более их нуклеиновых оснований, 2'- и/или 3'-положений на сахаре рибозы и их межсубъединичных связей. Варианты осуществления включают случай, где в 2'-положении осуществлена модификация с помощью F (рибо или арабино), и в 3'-положении находится O или NH. Варианты осуществления также включают случай, где в 2'-положении осуществлена модификация с помощью OMe, и в 3'-положении находится O или NH. Варианты осуществления включают случай, где в 2'-положении осуществлена модификация с помощью F (рибо или арабино), а также Me или OMe, и в 3'-положении находится O или NH. Варианты осуществления включают случай, где в 2'-положении осуществлена модификация с помощью F (рибо или арабино), и в 3'-положении находится O или NH. Варианты осуществления включают случай, где в 2'-положении осуществлена модификация с помощью O-метоксиэтокси, и в 3'-положении находится O или NH. Варианты осуществления также включают случай, где в 2'-положении осуществлена модификация с помощью F (рибо или арабино), и в 3'-положении находится O или NH. Варианты осуществления предусматривают случай, где в 2'- и 4'-положениях находится модифицированная мостиковая группа (как описано в другом месте данного документа) для образования конформационно ограниченного нуклеотида, и в 3'-положении находится O или NH. Каждый из этих вариантов осуществления может включать тиофосфатные (или тиофосфорамидатные, в зависимости от замещения в 3'-положении) и фосфорамидатные межсубъединичные связи.

[0063] Варианты осуществления также включают олигонуклеотиды, где в 2'-положении по меньшей мере одного нуклеотида находится H, и в 3'-положении находится NH. Каждый из этих вариантов осуществления может включать тиофосфорамидатные и/или фосфорамидатные межсубъединичные связи.

[0064] В некоторых вариантах осуществления каждый из модифицированных нуклеотидов домена X и домена Z соответственно включает модификацию, независимо выбранную из по меньшей мере одного из 2'-F, 2'-F-N3'→P5', 2'-OMe, 2'-OMe-N3'→P5', 2'-O-метоксиэтокси, 2'-O-метоксиэтокси-N3'→P5', конформационно ограниченных нуклеотидов.

[0065] В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид

содержит нуклеозид, представленный следующей формулой (A),



где А независимо в каждом случае представляет собой NH или O, В независимо в каждом случае представляет собой природное или немодифицированное нуклеиновое основание или модифицированное нуклеиновое основание, и каждый из R' и R'' независимо в каждом случае выбран из H, F, OH, OMe, OEt, O-метоксиэтокси, и R''' представляет собой H, или R' и R''' вместе образуют 2-4-атомный мостик с образованием конформационно ограниченного нуклеозида (например, -O-CH₂-, -O-CH(Me)- или -O-(CH₂)₂-).

[0066] В некоторых вариантах осуществления R' выбран из F, OH, -OMe, -OEt, O-метоксиэтокси; R'' представляет собой H и F; и R''' представляет собой H, Me или -OMe. В других вариантах осуществления R'' и R''' представляют собой H; и R' выбран из F, OMe, OEt и O-метоксиэтокси. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой NH в каждом случае.

[0067] Некоторые варианты осуществления предусматривают один или более модифицированных нуклеозидов, представленных формулой (A), где А представляет собой NH; В представляет собой G-фиксирующее основание; R' представляет собой F или OMe, и R'' представляет собой H; или R' представляет собой H, и R'' представляет собой H или F; и R''' представляет собой H.

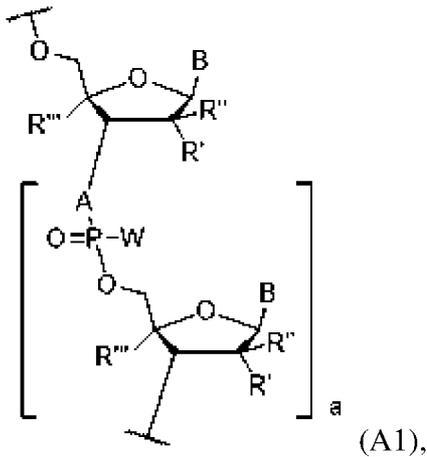
[0068] Некоторые варианты осуществления предусматривают один или более модифицированных нуклеозидов, представленных формулой (A), где А представляет собой NH; В представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание; R' и R''' вместе образуют конформационно ограниченный нуклеозид (например, -O-CH₂-, -O-CH(Me)- или -O-(CH₂)₂-); и R'' представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления В представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание, выбранное из группы, состоящей из 5-метилцитозина, 2,6-диаминопурина и 5-метилурацила.

[0069] Некоторые варианты осуществления предусматривают один или более модифицированных нуклеозидов, представленных формулой (A), где А представляет собой NH; В представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание; R' представляет собой F или OMe, R'' представляет собой H и R''' представляет собой H.

[0070] Некоторые варианты осуществления предусматривают один или более модифицированных нуклеозидов, представленных формулой (A), где А представляет собой NH; В представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание; R' представляет собой H, R'' представляет собой F, и R'''

представляет собой H.

[0071] В некоторых вариантах осуществления домены X и Z представлены формулой (A1),



где W независимо в каждом случае представляет собой OR или SR, где R представляет собой H или положительно заряженный противоион; R', R'', R''', A и B являются такими, как описано для формулы (A). В других вариантах осуществления A представляет собой O и R', R'' независимо представляют собой H или OEt, где по меньшей мере один из R', R'' представляет собой OEt.

[0072] Например, в дополнение к по меньшей мере одному нуклеотиду в каждом из доменов X и Z, где A представляет собой NH, W представляет собой S, и R' представляет собой MOE, нуклеотиды X и/или Z могут включать один или более нуклеотидов формулы A2, как описано в таблице A2, или один или более нуклеотидов формулы A3, как описано в таблице A3.

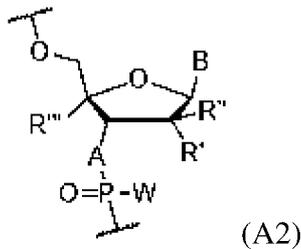


Таблица A2

№ нуклеотида	R'	R''	R'''	A	W
1	F	H	H	NH	S
2	F	H	H	NH	O
3	F	H	H	O	S
4	F	H	H	O	O
5	H	F	H	NH	S
6	H	F	H	NH	O
7	H	F	H	O	S
8	H	F	H	O	O

9	OMe	H	H	NH	S
10	OMe	H	H	NH	O
11	OMe	H	H	O	S
12	OMe	H	H	O	O
13	H	F	H	NH	S
14	H	F	H	NH	O
15	H	F	H	O	S
16	H	F	H	O	O
17	O-метоксиэтокси	H	H	NH	S
18	O-метоксиэтокси	H	H	NH	O
19	O-метоксиэтокси	H	H	O	S
20	O-метоксиэтокси	H	H	O	O
21	H	H	H	NH	S
22	H	H	H	NH	O
23	OH	H	H	NH	S
24	OH	H	H	NH	O
25	OH	H	H	O	S
26	H	OH	H	NH	O
27	H	OH	H	NH	S
28	H	OEt	H	NH	O
29	H	OEt	H	NH	S
30	H	OEt	H	O	O
31	H	OEt	H	O	S
32	OEt	H	H	NH	O
33	OEt	H	H	NH	S
34	OEt	H	H	O	O
35	OEt	H	H	O	S

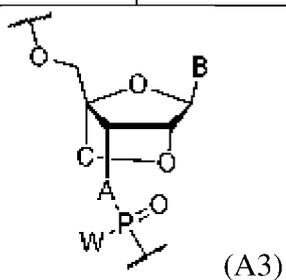


Таблица А3

№ нуклеотида	C	A	W
--------------	---	---	---

№ нуклеотида	C	A	W
36	-O-CH ₂ -	NH	S
37	-O-CH ₂ -	NH	O
38	-O-CH ₂ -	O	S
39	-O-CH ₂ -	O	O
40	-O-(CH ₂) ₂ -	NH	S
41	-O-(CH ₂) ₂ -	NH	O
42	-O-(CH ₂) ₂ -	O	S
43	-O-(CH ₂) ₂ -	O	O
44	-O-CH(Me)-	NH	S
45	-O-CH(Me)-	NH	O
46	-O-CH(Me)-	O	S
47	-O-CH(Me)-	O	O

[0073] В некоторых вариантах осуществления каждый из домена X и домена Z независимо содержит два, три или больше различных нуклеотидов 1-47.

[0074] Нуклеозиды домена X связаны посредством межсубъединичных связей, например, фосфорамидатных N3'→P5', тиофосфорамидатных N3'→P5', тиофосфатных, фосфодизфирных межсубъединичных связей или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления домен X связан посредством межсубъединичных связей, выбранных из фосфорамидатных N3'→P5', тиофосфорамидатных N3'→P5' и их комбинаций.

[0075] Домен X химерного олигонуклеотида может предусматривать определенное расположение модифицированных нуклеотидов. Например, в некоторых вариантах осуществления домен X содержит один или более конформационно ограниченных нуклеотидов. Конформационно ограниченные нуклеотиды могут включать BNA, такие как LNA и ENA (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 конформационно ограниченных нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления домен X содержит один или более 2'-F- и 2'-OMe-модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления домен X содержит чередующиеся конформационно ограниченные нуклеотиды, например, каждый второй нуклеотид представляет собой конформационно ограниченный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления домен X содержит один или более модифицированных нуклеотидов 2'-F и/или 2'-OMe (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 модифицированных нуклеотидов 2'-F- и/или 2'-OMe-). В некоторых вариантах осуществления домен X содержит чередующиеся 2'-F- и 2'-OMe-модифицированные нуклеотиды. В вариантах осуществления домен X содержит 2'-F- или 2'-OMe- и конформационно ограниченные нуклеотиды, например, в чередующейся последовательности.

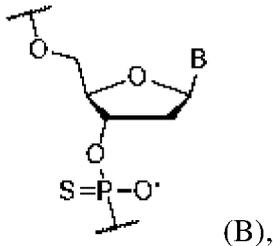
[0076] Домен Y содержит последовательность из 2-14 2'-дезоксинуклеотидов. Например, домен Y может содержать последовательность из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,

13 или 14 2'-дезоксинуклеотидов. Один или более из 2'-дезоксинуклеозидов могут быть связаны посредством тиофосфатных межсубъединичных связей (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 тиофосфатных межсубъединичных связей). В некоторых вариантах осуществления каждый из 2'-дезоксинуклеозидов связан посредством тиофосфатной межсубъединичной связи. В некоторых вариантах осуществления домен Y содержит по меньшей мере одну фосфодиэфирную межсубъединичную связь (например, 1, 2 или 3 фосфодиэфирных межсубъединичных связи). В других вариантах осуществления домен Y состоит из 2'-дезоксинуклеозидов, связанных посредством тиофосфатных межсубъединичных связей, и необязательно из одной или двух фосфодиэфирных межсубъединичных связей.

[0077] В вариантах осуществления домен Y содержит нуклеотиды, которые индуцируют расщепление РНКазой H.

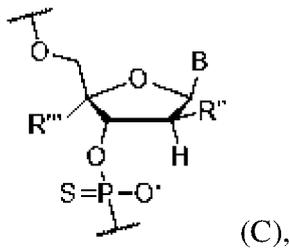
[0078] В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды формулы (A) включают нуклеотиды из таблицы A, где X_A представляет собой NH. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид формулы (A) расположен и модифицирован в соответствии с конструкциями, перечисленными в таблице B. В некоторых вариантах осуществления конструкция формулы (A) включает последовательность из 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеиновых оснований, отличную от последовательности, выбранной из последовательностей в таблице D. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид в олигонуклеотиде является нуклеотидом формулы (A).

[0079] В некоторых вариантах осуществления 2'-дезоксинуклеозид, связанный посредством тиофосфатной межсубъединичной связи, может быть представлен следующей формулой (B),



где B независимо в каждом случае представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание, B некоторых вариантах осуществления B представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание, выбранное из группы, состоящей из 5-метилцитозина, 2,6-диаминопурина и 5-метилурацила.

[0080] В других вариантах осуществления 2'-дезоксинуклеозид, связанный посредством тиофосфатной межсубъединичной связи, содержит модифицированный 2'-дезоксинуклеозид, который может быть модифицирован таким же образом, как и в доменах X и Z. Например, модифицированный 2'-дезоксинуклеозид, связанный посредством тиофосфатной межсубъединичной связи, может быть представлен следующей формулой (C),



где В независимо в каждом случае представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание, и каждый из R'' и R''' независимо в каждом случае выбран из H, F, Cl, OH, OMe, Me, O-метоксиэтокси, или R' и R''' вместе образуют 2-4-атомный мостик с образованием конформационно ограниченного нуклеозида. В некоторых вариантах осуществления В представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание, выбранное из группы, состоящей из 5-метилцитозина, 2,6-диаминопурина и 5-метилурацила. [0081] Домен Z содержит последовательность модифицированных нуклеотидов, где длина домена Z составляет 4-10 нуклеотидов. Например, домен Z может содержать последовательность из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов. Один или более из таких нуклеотидов модифицированы (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22). Например, в некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды в домене Z модифицированы.

[0082] Модифицированные нуклеотиды домена Z включают, например, модификацию, независимо выбранную из по меньшей мере одного из 2'-F, 2'-F-N3'→P5', 2'-OMe, 2'-OMe-N3'→P5', 2'-OEt-N3'→P5', 2'-O-метоксиэтокси, 2'-O-метоксиэтокси-N3'→P5', конформационно ограниченных нуклеотидов, тиофосфорамидата 2'-OH-N3'→P5' и фосфорамидата 2'-OH-N3'→P5'.

[0083] Нуклеотиды домена Z могут быть связаны посредством межузлединичных связей, таких как, например, фосфорамидатные N3'→P5', тиофосфорамидатные N3'→P5', тиофосфатные или фосфодиэфирные межузлединичные связи. В некоторых вариантах осуществления домен Z связан посредством фосфорамидатных N3'→P5', тиофосфорамидатных N3'→P5' межузлединичных связей и их комбинаций.

[0084] Домен Z химерного олигонуклеотида может предусматривать определенное расположение модифицированных нуклеотидов. Например, в некоторых вариантах осуществления домен Z содержит один или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или больше) конформационно ограниченных нуклеотидов (например, BNA, такие как LNA, ENA, каждый из которых может быть необязательно замещенным). В некоторых вариантах осуществления домен Z содержит чередующиеся конформационно ограниченные нуклеотиды, например, каждый второй нуклеотид представляет собой конформационно ограниченный нуклеотид (например, BNA, такой как LNA, ENA, каждый из которых может быть необязательно замещенным). В некоторых вариантах осуществления домен Z содержит один или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, или больше) 2'-F- и/или 2'-OMe-модифицированных нуклеотидов. Например, некоторые варианты осуществления предусматривают случай, где домен Z содержит чередующиеся

2'-F- и 2'-ОМе- модифицированные нуклеотиды, или домен Z содержит чередующиеся 2'-F- или 2'-ОМе- и конформационно ограниченные нуклеотиды.

[0085] В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды формул (VI) или (VI') включают 5-метилцитозиновые нуклеиновые основания, но не цитозин. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды формул (VI) или (VI') включают 2,6-диаминопуриновые нуклеиновые основания, но не аденин. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды формул (VI) или (VI') включают 5-метилурациловые нуклеиновые основания, но не урацил. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды формул (VI) или (VI') включают 2'-ОМе- и конформационно ограниченные нуклеотиды и связаны посредством тиофосфатных межсубъединичных связей, и модифицированные нуклеотиды включают 5-метилцитозиновые нуклеиновые основания, но не цитозин. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды формул (VI) или (VI') включают 2'-ОМе- модифицированные нуклеотиды с 5-метилурациловыми нуклеотидными основаниями, но не урацил.

[0086] В определенных вариантах осуществления нуклеотиды формул (VI) или (VI') в химерном олигонуклеотиде, содержащем последовательность, комплементарную по меньшей мере части последовательности гена MАРТ, расположены в соответствии с по меньшей мере одной из конструкций из таблицы В, где по меньшей мере одна межсубъединичная связь в доменах X и Z представляет собой связь NPS.

Таблица В

Домен X			Домен Y			Домен Z		
Номер нуклеи н. осн.	Между бьедин ичные связи	Замещени я нуклеино вых основани й	Номер нуклеин. осн.	Межс убъед ичные связи	Нукле иново е основ ание	Номер нуклеи н. осн.	Между бьедин ичные связи	Замещени я нуклеинов ых оснований
2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12	np, nps, ps, PO	A, G, C, T, U, DAP, 5meC, 5meU, G-фиксирую щее основание , DAP	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14	ps	A, G, C, T, U	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12	np, nps, ps, PO	A, G, C, T, U, DAP, 5meC, 5meU, G-фиксирую щее основание , DAP

[0087] В таблице В нуклеотиды в 5/каждом из доменов X и Z могут представлять собой один или более из пронумерованных нуклеотидов в таблицах А2 и А3. В некоторых вариантах осуществления химерные олигонуклеотиды из таблицы В включают по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше модифицированных нуклеотидов в таблице А. В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды X и/или Z представляют собой модифицированные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в таблице В выбраны из определенных модифицированных нуклеотидов, перечисленных в таблице А, таких как нуклеотиды с номерами 1-4, или 5-8, или 9-12, или 13-16, или 17-20, или 21-24, или 25-28, или 29-30, или 31-32 или 33. В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в таблице В выбраны из определенных модифицированных нуклеотидов, перечисленных в таблице А, таких как нуклеотиды с номерами 9-12 и 21-28, или 9-12 и 21-24, или 1-4 и 21-28, или 1-4 и 21-24, или 5-8 и 21-28, или 5-8 и 21-24. В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в таблице В выбраны из одного или двух, или трех модифицированных нуклеотидов, перечисленных в таблице А, таких как нуклеотиды с номерами 29-31 или 31-32, или 33. В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в таблице В выбраны из определенных модифицированных нуклеотидов, перечисленных в таблице А, таких как нуклеотиды с номерами 29 или 31, или 33. Нуклеотиды в домене Y из таблицы В могут включать нуклеотиды формулы В.

[0088] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид из таблицы В конъюгирован по 5'- и/или 3'-концу с лиганд-нацеленной группой и/или липидным фрагментом.

[0089] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотидные соединения по настоящему изобретению включают следующие последовательности нуклеиновых оснований, представленные в таблице С.

Таблица С

Последовательности нуклеиновых оснований (5'-3')
5'- GCTTTTACTGACCATGCGAG -3' (SEQ ID NO: 1)

[0090] В вариантах осуществления олигонуклеотид включает последовательность под SEQ ID NO: 1. В вариантах осуществления последовательность под SEQ ID NO: 1 модифицирована в соответствии с по меньшей мере одной из раскрытых модификаций. В вариантах осуществления SEQ ID NO: 1 модифицирована с наличием тиофосфорамидатной связи и модификации 2'-метоксиэтокси (2'MOE) в по меньшей мере первых двух нуклеотидах с 5'- и 3'-концов олигонуклеотида. В вариантах осуществления SEQ ID NO: 1 модифицирована с наличием модификации 2'MOE в по меньшей мере первых трех нуклеотидах с 5'- и 3'-концов олигонуклеотида. В вариантах осуществления SEQ ID NO: 1 модифицирована с наличием модификации 2'MOE в по меньшей мере первых четырех нуклеотидах с 5'- и 3'-концов олигонуклеотида. В вариантах осуществления SEQ ID NO: 1 модифицирована с наличием модификации 2'MOE в по меньшей мере первых пяти нуклеотидах с 5'- и 3'-концов олигонуклеотида. В вариантах осуществления SEQ ID NO: 1 модифицирована с наличием модификации 2'MOE в по

меньшей мере первых шести нуклеотидах с 5'- и 3'-концов олигонуклеотида.

[0091] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, содержащий последовательность, комплементарную по меньшей мере части последовательности гена MART, содержит модифицированную последовательность в соответствии с модифицированной последовательностью из таблицы D, где X независимо в каждом случае представляет собой природное или немодифицированное нуклеиновое основание или модифицированное нуклеиновое основание. В некоторых вариантах осуществления каждый X независимо выбран из A, C, G, U, T, 2,6-диаминопурина, 5-Ме-пиримидина (например, 5-метилцитозина, 5-метилурацила) и g-фиксирующего основания. В вариантах осуществления SEQ ID NO: 1 модифицирована в соответствии с модифицированными последовательностями из таблицы D таким образом, что каждый X в таблице D соответствует каждому из нуклеиновых оснований из SEQ ID NO: 1.

Таблица D

Модифицированная последовательность (5'-3')
5'- moeXnpsmoeXnpsmoeXnpsmoeXnpsmoeXnpsXpsXpsXpsXpsXpsXpsXpsXpsXpsXpsmoeX npsmoeXnpsmoeXnpsmoeXnpsmoeXn-3'
5'- moeGnpsmoeCnps(5m)moeUnps(5m)moeUnps(5m)moeUnpsTpsApsCpsTpsGpsApsCpsCps ApsTpsmoeGnpsmoeCnpsmoeGnpsmoeAnpsmoeGn-3'-NPS модифицированная SEQ ID NO: 1

[0092] В вариантах осуществления каждый из нуклеотидов домена модифицирован. В вариантах осуществления каждый из нуклеотидов домена имеет одинаковые модификации. В вариантах осуществления каждый из нуклеотидов доменов X и Z модифицирован. В вариантах осуществления каждый из нуклеотидов доменов X и Z имеет одинаковые модификации. В вариантах осуществления каждый из нуклеотидов домена модифицирован с помощью 2'МОЕ. В вариантах осуществления каждый из нуклеотидов доменов X и Z модифицирован с помощью 2'МОЕ. В вариантах осуществления каждый из нуклеотидов домена модифицирован с помощью 2'ОМе. В вариантах осуществления каждый из нуклеотидов доменов X и Z модифицированы с помощью 2'ОМе. В вариантах осуществления каждый из нуклеотидов домена модифицирован с помощью 2'ОEt. В вариантах осуществления каждый из нуклеотидов доменов X и Z модифицированы с помощью 2'ОEt. В вариантах осуществления каждый из нуклеотидов доменов X и Z связан с помощью NPS-связи. В вариантах осуществления домены X и Z имеют одинаковое количество нуклеотидов. В вариантах осуществления каждый из доменов X и Z имеет 4-8 нуклеотидов. В вариантах осуществления каждый из доменов X и Z имеет 5-6 нуклеотидов. В вариантах осуществления каждый из доменов X и Z имеет 5 нуклеотидов. В вариантах осуществления домен Y имеет по меньшей мере двойное количество нуклеотидов по сравнению с каждым из доменов X и Z. В вариантах

осуществления домен Y имеет 8-12 нуклеотидов. В вариантах осуществления домен Y имеет 10 нуклеотидов. В вариантах осуществления каждый из нуклеотидов домена Y связан с помощью PS-связи. В вариантах осуществления по меньшей мере одно нуклеиновое основание олигонуклеотида модифицировано. В вариантах осуществления по меньшей мере одно нуклеиновое основание, прилегающее к 3'-терминальному концу олигонуклеотида, модифицировано. В вариантах осуществления по меньшей мере одно нуклеиновое основание в домене Z олигонуклеотида модифицировано. В вариантах осуществления по меньшей мере одно нуклеиновое основание в домене Y олигонуклеотида модифицировано.

[0093] Олигонуклеотиды по настоящему изобретению также включают олигонуклеотид, содержащий последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности нуклеиновых оснований, выбранной из последовательностей, перечисленных в таблице C, независимо от модификаций последовательностей, перечисленных в таблицах B и D. В некоторых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4, 5 нуклеиновых оснований отличаются от последовательностей, перечисленных в таблице C, независимо от модификаций последовательностей, перечисленных в таблицах B и D.

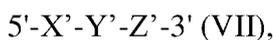
[0094] В вариантах осуществления раскрытые олигонуклеотиды продемонстрировали повышенную аффинность в отношении целевой последовательности нуклеиновой кислоты по сравнению с немодифицированным олигонуклеотидом, содержащим такую же последовательность. Например, в некоторых последовательностях раскрытый олигонуклеотид имеет последовательность нуклеиновых оснований, которая комплементарна целевой последовательности нуклеиновой кислоты или гибридизируется с ней с более высокой аффинностью, чем немодифицированный олигонуклеотид, содержащий такую же последовательность. В вариантах осуществления раскрытый олигонуклеотид, образующий комплекс с комплементарной целевой последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризуется температурой плавления (T_m) $> 37^\circ\text{C}$. Комплекс может быть образован при физиологических условиях или близких к физиологическим условиям, как например, в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). В вариантах осуществления T_m комплекса составляет $> 50^\circ\text{C}$. В вариантах осуществления T_m комплекса составляет $50-100^\circ\text{C}$. В вариантах осуществления T_m раскрытого олигонуклеотида, образующего дуплекс с целевой последовательностью нуклеиновой кислоты при физиологических условиях или близких к физиологическим условиям, составляет $> 50^\circ\text{C}$.

[0095] В определенных вариантах осуществления целевая последовательность нуклеиновой кислоты может быть выбрана из последовательности нуклеиновой кислоты, которая представляет собой известную последовательность ДНК или РНК, такой как ген MART. Ген MART может представлять собой последовательность ДНК или РНК, такую как экзон 5, экзон 10 или экзон 12.

[0096] В вариантах осуществления раскрытые олигонуклеотиды проявляют

аффинность в отношении по меньшей мере части гена MART или его РНК-эквивалентов, таких как mRNA MART, и/или демонстрируют стабильность в комплексе с по меньшей мере частью гена MART или его РНК-эквивалентами. В вариантах осуществления олигонуклеотид, образующий комплекс с комплементарной последовательностью гена MART, имеет температуру плавления (T_m) $> 37^\circ\text{C}$. Ген MART может включать последовательность РНК, такую как экзон 5, экзон 10 или экзон 12. Комплекс может быть образован при физиологических условиях или близких к физиологическим условиям, как например, в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). В вариантах осуществления T_m комплекса составляет $> 50^\circ\text{C}$. В вариантах осуществления T_m комплекса составляет $50-100^\circ\text{C}$. В вариантах осуществления T_m раскрытого олигонуклеотида, образующего дуплекс с геном MART при физиологических условиях или близких к физиологическим условиям, составляет $> 50^\circ\text{C}$.

[0097] Соединения по настоящему изобретению включают олигонуклеотидную конструкцию, имеющую последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную по меньшей мере части гена MART, при этом конструкция характеризуется следующей формулой (VII),



где X'-Y'-Z' представляет собой химерный олигонуклеотид, содержащий последовательность из 14-22 нуклеозидов и необязательно конъюгированный по 5'- и/или 3'-концу с лиганд-нацеленной группой, X' представляет собой домен, содержащий последовательность модифицированных нуклеозидов длиной 3-14 нуклеозидов; Y' представляет собой домен, содержащий последовательность из 2-4 2'-дезоксинуклеозидов, связанных посредством межсубъединичных связей; и Z' представляет собой домен, содержащий последовательность модифицированных нуклеозидов длиной 3-14 нуклеозидов, где домены X' и/или Y' содержат один или более модифицированных нуклеозидов, которые связаны посредством фосфорамидатной $\text{N3}'\rightarrow\text{P5}'$ или тиофосфорамидатной $\text{N3}'\rightarrow\text{P5}'$ межсубъединичной связи.

[0098] Химерный олигонуклеотид, представленный X'-Y'-Z' формулы (VII), содержит последовательность из 14-22 нуклеотидов, например, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления количество нуклеотидов в каждом из X', Y' и Z' соответственно составляет 8/2/10, 9/2/10, 10/2/10, 7/3/10, 8/3/10, 9/3/10, 8/4/8, 9/4/9, 6/4/8. В некоторых вариантах осуществления длина X' составляет 6-10, длина Y' составляет 2-4 и длина Z' составляет 8-10 нуклеотидов.

[0099] В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (VII) состоит из химерного олигонуклеотида X'-Y'-Z', состоящего из последовательности из 14-22 нуклеотидов, и необязательно конъюгированного по 5'- и/или 3'-концу (например, 5'-концу, 3'-концу или как 5'-, так и 3'-концу) с лиганд-нацеленной группой, где X' представляет собой домен, состоящий из последовательности, содержащей один или более модифицированных нуклеотидов, длина которой составляет 3-10 нуклеотидов; Z' представляет собой домен, состоящий из последовательности, содержащей один или

более модифицированных нуклеотидов, длина которой составляет 3-10 нуклеотидов; и Y' представляет собой домен, состоящий из последовательности из 2-4 2'-дезоксинуклеотидов, связанных посредством тиофосфатных межсубъединичных связей и, необязательно, одной фосфодиэфирной межсубъединичной связи, где домены X' и/или Y' содержат один или более модифицированных нуклеотидов, которые связаны посредством фосфорамидатной N3'→P5' или тиофосфорамидатной N3'→P5' межсубъединичной связи.

[0100] Домен X' содержит последовательность модифицированных нуклеотидов, где длина домена X' составляет 4-10 нуклеотидов. Например, домен X' может содержать последовательность из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов. Один или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22) из таких нуклеотидов модифицированы. Например, в некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды в домене X' модифицированы.

[0101] Модифицированные нуклеотиды домена X' могут быть такими же, как раскрытые для X в формуле (VI) или (VI'). Например, нуклеотиды домена X' могут быть модифицированы по отношению к одному или более из их нуклеиновых оснований, положениям 2' и/или 3' на сахаре рибозы и их межсубъединичным связям. Варианты осуществления включают случай, где в 2'-положении осуществлена модификация с помощью F (рибо или арабино), и в 3'-положении находится O или NH. Варианты осуществления также включают случай, где в 2'-положении осуществлена модификация с помощью OMe, и в 3'-положении находится O или NH. Варианты осуществления включают случай, где в 2'-положении осуществлена модификация с помощью F (рибо или арабино), а также Me или OMe, и в 3'-положении находится O или NH. Варианты осуществления включают случай, где в 2'-положении осуществлена модификация с помощью F (рибо или арабино), и в 3'-положении находится O или NH. Варианты осуществления включают случай, где в 2'-положении осуществлена модификация с помощью O-метоксиэтокси, и в 3'-положении находится O или NH. Варианты осуществления также включают случай, где в 2'-положении осуществлена модификация с помощью F (рибо или арабино), и в 3'-положении находится O или NH. Варианты осуществления предусматривают случай, где в 2'- и 4'-положениях находится модифицированная мостиковая группа (как описано в другом месте данного документа) для образования конформационно ограниченного нуклеотида, и в 3'-положении находится O или NH. Каждый из этих вариантов осуществления может включать тиофосфатные (или тиофосфорамидатные, в зависимости от замещения в 3'-положении) и фосфорамидатные межсубъединичные связи.

[0102] Варианты осуществления также включают случаи, где в 2'-положении находится OH, и в 3'-положении находится NH, или где в 2'-положении находится H, и в 3'-положении находится NH. Каждый из этих вариантов осуществления может включать тиофосфорамидатные и/или фосфорамидатные межсубъединичные связи.

[0103] Нуклеотиды домена X' связаны посредством межсубъединичных связей, например, фосфорамидатных N3'→P5', тиофосфорамидатных N3'→P5', тиофосфатных

или фосфодиэфирных межсубъединичных связей. В некоторых вариантах осуществления домен X' связан посредством межсубъединичных связей, выбранных из фосфорамидатных $N3' \rightarrow P5'$, тиофосфорамидатных $N3' \rightarrow P5'$ и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления домен X' содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 из фосфорамидатной $N3' \rightarrow P5'$ и/или тиофосфорамидатной $N3' \rightarrow P5'$ межсубъединичных связей.

[0104] Домен Y' содержит последовательность из 2-4 2'-дезоксинуклеотидов. Например, домен Y' может содержать последовательность из 2, 3 или 4 2'-дезоксинуклеотидов. Один или более из 2'-дезоксинуклеотидов могут быть связаны посредством тиофосфатных или фосфодиэфирных межсубъединичных связей (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22). В некоторых вариантах осуществления каждый из 2'-дезоксинуклеотидов связан посредством тиофосфатной межсубъединичной связи. В других вариантах осуществления каждый из 2'-дезоксинуклеотидов связан посредством фосфодиэфирной межсубъединичной связи. В других вариантах осуществления домен Y' состоит из 2'-дезоксинуклеотидов, связанных посредством тиофосфатных межсубъединичных связей, и необязательно одной фосфодиэфирной межсубъединичной связи.

[0105] Домен Z' содержит последовательность модифицированных нуклеотидов, где длина домена Z' составляет 4-10 нуклеотидов. Например, домен Z' может содержать последовательность из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов. Один или более из таких нуклеотидов модифицированы (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22). Например, в некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды в домене Z' модифицированы.

[0106] Модифицированные нуклеотиды домена Z' могут быть такими же, как раскрытые для Z в формуле (VI) или (VI'). Например, нуклеотиды домена Z' могут быть модифицированы по отношению к одному или более из их нуклеиновых оснований, положениям 2' и/или 3' на сахаре рибозы и их межсубъединичным связям. Варианты осуществления включают случай, где в 2'-положении осуществлена модификация с помощью F (рибо или арабино), и в 3'-положении находится O или NH. Варианты осуществления также включают случай, где в 2'-положении осуществлена модификация с помощью OMe, и в 3'-положении находится O или NH. Варианты осуществления включают случай, где в 2'-положении осуществлена модификация с помощью F (рибо или арабино), а также Me или OMe, и в 3'-положении находится O или NH. Варианты осуществления включают случай, где в 2'-положении осуществлена модификация с помощью F (рибо или арабино), и в 3'-положении находится O или NH. Варианты осуществления включают случай, где в 2'-положении осуществлена модификация с помощью O-метоксиэтокси, и в 3'-положении находится O или NH. Варианты осуществления также включают случай, где в 2'-положении осуществлена модификация с помощью F (рибо или арабино), и в 3'-положении находится O или NH. Варианты осуществления предусматривают случай, где в 2'- и 4'-положениях находится

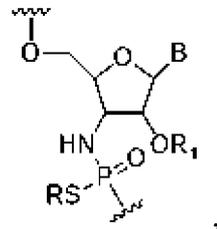
модифицированная мостиковая группа (как описано в другом месте данного документа) для образования конформационно ограниченного нуклеотида, и в 3'-положении находится О или NH. Каждый из этих вариантов осуществления может включать тиофосфатные (или тиофосфорамидатные, в зависимости от замещения в 3'-положении) и фосфорамидатные межсубъединичные связи.

[0107] Варианты осуществления также включают олигонуклеотиды, содержащие нуклеотиды, где в 2'-положении находится OH, и в 3'-положении находится NH, или где в 2'-положении находится H, и в 3'-положении находится NH. Каждый из этих вариантов осуществления может включать тиофосфорамидатные и/или фосфорамидатные межсубъединичные связи.

[0108] Нуклеотиды домена Z' связаны посредством межсубъединичных связей, например, фосфорамидатных N3'→P5', тиофосфорамидатных N3'→P5', тиофосфатных или фосфодиэфирных межсубъединичных связей. В некоторых вариантах осуществления домен Z' связан посредством межсубъединичных связей, выбранных из фосфорамидатных N3'→P5', тиофосфорамидатных N3'→P5' и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления домен Z' содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 из фосфорамидатной N3'→P5' и/или тиофосфорамидатной N3'→P5' межсубъединичных связей.

[0109] Дополнительные варианты осуществления предусматривают олигонуклеотид, содержащий

(A) один или более нуклеотидов следующей формулы,



где R представляет собой H или положительно заряженный противоион, B представляет собой нуклеиновое основание, R₁ представляет собой -(CH₂)₂OCH₃ или -OCH₃, и

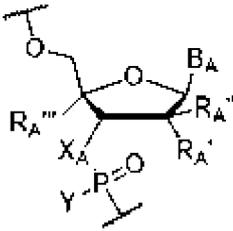
(B) домен, содержащий последовательность из 2-10 2'-дезоксинуклеозидов, связанных посредством тиофосфатных межсубъединичных связей. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает домен, содержащий последовательность из 10 2'-дезоксинуклеозидов, связанных посредством тиофосфатных межсубъединичных связей.

Модифицированные антисмысловые олигонуклеотиды

[0110] Другие соединения включают модифицированные антисмысловые олигонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления ASO включает нуклеотид формулы (I), (II), (IIIa), (IIIb), (IV), (V) и/или (V').

[0111] Другие соединения по настоящему изобретению включают олигонуклеотид,

имеющий последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную по меньшей мере части гена MАРТ, олигонуклеотид, содержащий по меньшей мере один нуклеотид, характеризующийся следующей формулой (VIII),



(VIII),

где X_A представляет собой NH или O, Y представляет собой OR SR, где R представляет собой H или положительно заряженный противоион, B_A независимо в каждом случае представляет собой природное или немодифицированное нуклеиновое основание или модифицированное нуклеиновое основание, каждый из R_A' и R_A'' независимо в каждом случае выбран из H, F, OH, OMe, O-метоксиэтокси, и R_A''' представляет собой H, или R_A' и R_A''' вместе образуют $-O-CH_2-$, $-O-CH(Me)-$ или $-O-(CH_2)_2-$.

[0112] В некоторых вариантах осуществления R_A' и R_A''' представляют собой H; и R_A'' выбран из F, OH, OMe, Me, O-метоксиэтокси. В других вариантах осуществления R_A'' и R_A''' представляют собой H; и R_A' выбран из F, OMe, Me, O-метоксиэтокси. В некоторых вариантах осуществления X_A представляет собой NH в каждом случае.

[0113] Некоторые варианты осуществления предусматривают один или более модифицированных нуклеозидов, представленных формулой (VIII), где X_A представляет собой NH; B_A представляет собой G-фиксирующее основание; R_A' представляет собой F или OMe, и R_A'' представляет собой H; или R_A' представляет собой H, и R_A'' представляет собой H или F; и R_A''' представляет собой H.

[0114] Некоторые варианты осуществления предусматривают один или более модифицированных нуклеотидов, представленных формулой (VIII), где X_A представляет собой NH; B_A представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание; R_A' и R_A''' вместе образуют конформационно ограниченный нуклеотид (например, $-O-CH_2-$ или $-O-(CH_2)_2-$); и R_A'' представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления B_A представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание, выбранное из группы, состоящей из 5-метилцитозина, 2,6-диаминопурина и 5-метилурацила.

[0115] Некоторые варианты осуществления предусматривают один или более модифицированных нуклеотидов, представленных формулой (VIII), где X_A представляет собой NH; B представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание; R_A' представляет собой F или OMe, R_A'' представляет собой H, и R_A''' представляет собой H.

[0116] Некоторые варианты осуществления предусматривают один или более модифицированных нуклеотидов, представленных формулой (VIII), где X_A представляет

собой NH; B_A представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание; R_A' представляет собой H, R_A'' представляет собой F и R_A''' представляет собой H.

[0117] В некоторых вариантах осуществления X_A представляет собой NH. В других вариантах осуществления Y представляет собой O^- или S^- (с положительно заряженным противоионом). В некоторых вариантах осуществления R_A' или R_A'' представляют собой H, а другое представляет собой F, OH, OMe, Me, O-метоксиэтокси (например, арабино-F, или рибо-F, или OMe).

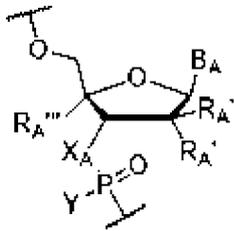
[0118] В некоторых вариантах осуществления B_A выбран из A, C, G, U и T. В дополнительных вариантах осуществления B_A выбран из A, C, G, U, T, 2,6-диаминопурин, 5-Ме-пиримидин (например, 5-метилцитозин, 5-метилурацил). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из R_A' и R_A'' представляет собой H. Например, в некоторых вариантах осуществления R_A' представляет собой F, OH, OMe, Me, O-метоксиэтокси, и R_A'' представляет собой H. В других вариантах осуществления R_A' представляет собой H, и R_A'' представляет собой F.

[0119] В некоторых вариантах осуществления, в случае если B_A представляет собой пуриновое нуклеиновое основание, по меньшей мере один из R_A' и R_A'' представляет собой OH или F, и/или в случае если B_A представляет собой пиримидиновое нуклеиновое основание, по меньшей мере один из R_A' и R_A'' представляет собой OMe, OH или F.

[0120] В других вариантах осуществления нуклеотиды включают один или более нуклеотидов в таблице E или таблице F.

Таблица E

№ нуклеотида	R'	R''	R'''	A	W
48	F	H	H	NH	S
49	F	H	H	NH	O
50	F	H	H	O	S
51	F	H	H	O	O
52	H	F	H	NH	S
53	H	F	H	NH	O
54	H	F	H	O	S
55	H	F	H	O	O
56	OMe	H	H	NH	S
57	OMe	H	H	NH	O



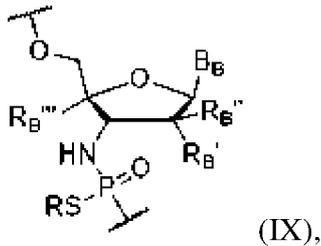
58	OMe	H	H	O	S
59	OMe	H	H	O	O
60	H	F	H	NH	S
61	H	F	H	NH	O
62	H	F	H	O	S
63	H	F	H	O	O
64	O-метоксиэтокси	H	H	NH	S
65	O-метоксиэтокси	H	H	NH	O
66	O-метоксиэтокси	H	H	O	S
67	O-метоксиэтокси	H	H	O	O
68	H	H	H	NH	S
69	H	H	H	NH	O
70	OH	H	H	NH	S
71	OH	H	H	NH	O
72	OH	H	H	O	S
73	H	OH	H	NH	O
74	H	OH	H	NH	S
75	H	OEt	H	NH	O
76	H	OEt	H	NH	S
77	H	OEt	H	O	O
78	H	OEt	H	O	S
79	OEt	H	H	NH	O
80	OEt	H	H	NH	S
81	OEt	H	H	O	O
82	OEt	H	H	O	S

Таблица F

№ нуклеотида	C	A	W
83	-O-CH ₂ -	NH	S
84	-O-CH ₂ -	NH	O

85	-O-CH ₂ -	O	S
86	-O-CH ₂ -	O	O
87	-O-(CH ₂) ₂ -	NH	S
88	-O-(CH ₂) ₂ -	NH	O
89	-O-(CH ₂) ₂ -	O	S
90	-O-(CH ₂) ₂ -	O	O
91	-O-CH(Me)-	NH	S
92	-O-CH(Me)-	NH	O
93	-O-CH(Me)-	O	S
94	-O-CH(Me)-	O	O

[0121] Соединения по настоящему изобретению также включают олигонуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную по меньшей мере части гена MАРТ, олигонуклеотид, содержащий по меньшей мере десять нуклеотидов, характеризующихся следующей формулой (IX),



где R представляет собой H или положительно заряженный противоион, В_В независимо в каждом случае представляет собой природное или немодифицированное нуклеиновое основание или модифицированное нуклеиновое основание, каждый из R_В' и R_В'' независимо в каждом случае выбран из H, F, OMe, O-метоксиэтокси, и R_В''' представляет собой H, или R_В' и R_В''' вместе образуют -O-CH₂-, -O-CH(Me)- или -O-(CH₂)₂-.

[0122] В некоторых вариантах осуществления каждый олигонуклеотид представляет собой нуклеотид формулы (IX).

[0123] В некоторых вариантах осуществления R_В' и R_В''' представляют собой H, и R_В'' выбран из F, OH, OMe, Me, O-метоксиэтокси. В других вариантах осуществления R_В'' и R_В''' представляют собой H; и R_В' выбран из F, OMe, Me, O-метоксиэтокси.

[0124] Некоторые варианты осуществления предусматривают один или более модифицированных нуклеотидов, представленных формулой (IX), где В_А представляет собой G-фиксирующее основание; R_В' представляет собой F или OMe, и R_В'' представляет собой H; или R_В' представляет собой H, и R_В'' представляет собой H или F; и R_В''' представляет собой H.

[0125] Некоторые варианты осуществления предусматривают один или более модифицированных нуклеотидов, представленных формулой (IX), где В_А представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание; R_В' и R_В'''

вместе образуют конформационно ограниченный нуклеотид (например, $-\text{O}-\text{CH}_2-$ или $-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-$); и R_B'' представляет собой Н. В некоторых вариантах осуществления B_A представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание, выбранное из группы, состоящей из 5-метилцитозина, 2,6-диаминопурина и 5-метилурацила.

[0126] Некоторые варианты осуществления предусматривают один или более модифицированных нуклеотидов, представленных формулой (IX), где В представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание; R_B' представляет собой F или OMe, R_B'' представляет собой Н и R_B''' представляет собой Н.

[0127] Некоторые варианты осуществления предусматривают один или более модифицированных нуклеотидов, представленных формулой (IX), где B_A представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание; R_B' представляет собой Н, R_B'' представляет собой F, и R_B''' представляет собой Н.

[0128] В других вариантах осуществления Y представляет собой S^- (с положительно заряженным противоионом). В некоторых вариантах осуществления R_B' или R_B'' представляет собой Н, а другой представляет собой F, OH, OMe, Me, O-метоксиэтокси (например, арабино-F, или рибо-F, или OMe).

[0129] В некоторых вариантах осуществления B_B выбран из A, C, G, U и T. В дополнительных вариантах осуществления B_B выбран из A, C, G, U, T, 2,6-диаминопурина, 5-Me пиримидина (например, 5-метилцитозина). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из R_B' и R_B'' представляет собой Н. Например, в некоторых вариантах осуществления R_A' представляет собой F, OH, OMe, Me, O-метоксиэтокси, и R_B'' представляет собой Н. В других вариантах осуществления R_B' представляет собой Н, и R_B'' представляет собой F.

[0130] В некоторых вариантах осуществления, в случае если B_B представляет собой пуриновое нуклеиновое основание, по меньшей мере один из R_B' и R_B'' представляет собой OH или F, и/или в случае если B_B представляет собой пиримидиновое нуклеиновое основание, по меньшей мере один из R_B' и R_B'' представляет собой OMe, OH или F.

[0131] В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновых оснований олигонуклеотида формул (VIII) или (IX) предусматривает последовательность, выбранную из последовательностей в таблице A. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновых оснований олигонуклеотида формул (VIII) или (IX) содержит последовательность из 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеиновых оснований, отличную от последовательности, выбранной из последовательностей в таблице D.

[0132] В вариантах осуществления раскрытые олигонуклеотиды проявляют аффинность в отношении по меньшей мере части гена MАРТ или его РНК-эквивалентов и/или демонстрируют стабильность в комплексе с по меньшей мере одной из следующих шести последовательностей по меньшей мере части гена MАРТ или его РНК-эквивалентов. В вариантах осуществления олигонуклеотид, образующий комплекс с комплементарной последовательностью гена MАРТ, имеет температуру плавления (T_m) >

37°C. Ген МАРТ может представлять собой последовательность РНК, такую как экзон 5, экзон 10 или экзон 12. Комплекс может быть образован при физиологических условиях или близких к физиологическим условиям, как например, в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). В вариантах осуществления T_m комплекса составляет $> 50^\circ\text{C}$. В вариантах осуществления T_m комплекса составляет $50\text{-}100^\circ\text{C}$. В вариантах осуществления T_m раскрытого олигонуклеотида, образующего дуплекс с по меньшей мере частью гена МАРТ при физиологических условиях или близких к физиологическим условиям, составляет $> 50^\circ\text{C}$.

[0133] В некоторых аспектах настоящего изобретения последовательность нуклеиновых оснований олигонуклеотида формулы (VIII) или (IX) включает последовательность из 12-22 нуклеотидов, например, 14-20 нуклеотидов или 16-19 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина последовательности нуклеиновых оснований олигонуклеотида формулы (VIII) или (IX) составляет 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 нуклеотида.

[0134] В другом аспекте раскрытия описанные в данном документе олигонуклеотиды конъюгированы или модифицированы на одном или более концах олигонуклеотида.

[0135] Например, в некоторых вариантах осуществления концевой участок олигонуклеотида защищен от гидролитического расщепления по меньшей мере одним модифицированным нуклеотидом на указанном концевом участке. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид представляет собой модифицированный нуклеотид, предусматривающий модифицированный нуклеотид, который содержит модификацию 3'-N, и может включать тиофосфорамидатную межсубъединичную связь. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды формул (VIII) и (IX) дополнительно содержат по меньшей мере один нуклеотид (например, 1 или 2) на 3'-и/или 5'-конце, который содержит тиофосфатную межсубъединичную связь и тиминное нуклеиновое основание. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды формул (VIII) и (IX) дополнительно содержат по меньшей мере один нуклеотид (например, 1 или 2) на 3'- и/или 5'-конце, который содержит 2'-ОМе-модифицированный нуклеотид и тиминное нуклеиновое основание. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды формул (VIII) и (IX) дополнительно содержат по меньшей мере один 2'-ОМе-модифицированный нуклеотид на 3'- и/или 5'-конце, который содержит тиофосфатную межсубъединичную связь и урациловое нуклеиновое основание. В некоторых вариантах воплощения инвертированный dT может быть включен на 3'-конце олигонуклеотидов формул (VIII) и (IX), что приводит к образованию 3'-3'-связи, которая может ингибировать разрушение 3'-эксонуклеазами и/или удлинение ДНК-полимеразами.

Конъюгированные олигонуклеотиды

[0136] Настоящее изобретение также направлено на дополнительные компоненты, конъюгированные с олигонуклеотидом, такие как нацеливающиеся фрагменты и олигонуклеотиды, модифицированные на одном или более концах.

[0137] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе олигонуклеотиды конъюгированы с одной или более лиганд-нацеленными группами, необязательно посредством связывающего фрагмента, такого как линкер НЕG или амиолинкер С6 или С7. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды, описанные в данном документе, дополнительно содержат лиганд-нацеленную группу, конъюгированную по 5'- и/или 3'-концу посредством необязательного линкера. В предпочтительных вариантах осуществления описанные в данном документе олигонуклеотиды дополнительно содержат лиганд-нацеленную группу, конъюгированную по 5'- и/или 3'-концу посредством необязательного линкера. В некоторых вариантах осуществления конъюгирование происходит на 3'-конце описанных в данном документе олигонуклеотидов.

[0138] В некоторых вариантах осуществления лиганд-нацеленная группа увеличивает активность, клеточное распределение или клеточное поглощение олигонуклеотида конкретным типом клеток, таким как клетки ЦНС.

[0139] В некоторых вариантах осуществления лиганд-нацеленная группа может представлять собой липидный фрагмент, такой как токоферолы, и жирные кислоты, такие как гексадекановые кислоты (пальмитиновая кислота) и октановые кислоты, такие как дитиооктановая кислота (липоевая кислота), пальмитоилловый фрагмент.

[0140] В некоторых вариантах осуществления концевой участок олигонуклеотида защищен от гидролитического расщепления по меньшей мере одним модифицированным нуклеотидом на концевом участке. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид представляет собой модифицированный нуклеотид, предусматривающий модифицированный нуклеотид, который содержит модификацию 3'-N, и может включать тиофосфорамидатную межсубъединичную связь. В некоторых вариантах осуществления нить олигонуклеотида дополнительно содержит по меньшей мере один нуклеотид (например, 1 или 2) на 3'- и/или 5'-конце, который содержит тиофосфатную межсубъединичную связь и тиминное нуклеиновое основание. В некоторых вариантах осуществления нить олигонуклеотида дополнительно содержит по меньшей мере один нуклеотид (например, 1 или 2) на 3'- и/или 5'-конце, который содержит 2'-F-, 2'-OMe-, 2'-OEt- или 2'-MOE-модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления нить олигонуклеотида дополнительно содержит по меньшей мере один 2'-OMe-модифицированный нуклеотид на 3'- и/или 5'-конце, который содержит тиофосфатную межсубъединичную связь и урациловое нуклеиновое основание. В вариантах осуществления 3'-конец ASO присоединен посредством связи пр или ро к амиолинкеру С6, дополнительно связанному с нацеливающимся фрагментом.

[0141] В некоторых вариантах осуществления инвертированный dT может быть включен на 3'-конце олигонуклеотидной нити, что приводит к образованию 3'-3'-связи, что может приводить к ингибированию разрушения 3'-эксонуклеазами и/или удлинению ДНК-полимеразами.

2. Композиции

[0142] Настоящее изобретение также охватывает фармацевтические композиции, содержащие олигонуклеотиды по настоящему изобретению. Один вариант осуществления представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую олигонуклеотид формулы (I), (II), (III), (IV), (V) или (VI), или другой олигонуклеотид по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

[0143] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая олигонуклеотид по настоящему изобретению, составлена для доставки в центральную нервную систему (ЦНС), такой как интратекальная или интрацеребровентрикулярная доставка. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая олигонуклеотид по настоящему изобретению, составлена для системного введения посредством парентеральной доставки. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутривентрикулярную или внутримышечную инъекцию или инфузию; также подкожное введение, например, посредством имплантированного устройства. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая олигонуклеотид по настоящему изобретению, составлена для интратекальной или интрацеребровентрикулярной доставки. Составы для введения в ЦНС могут включать стерильную водную суспензию, которая также может содержать буферы, разбавители и другие фармацевтически приемлемые добавки, как понятно специалисту в данной области.

[0144] Фармацевтические композиции, содержащие олигонуклеотид по настоящему изобретению, применимы для лечения заболевания или нарушения, например, связанного с экспрессией или активностью гена AD.

3. Способы применения

[0145] Один аспект настоящей технологии включает способы лечения субъекта, у которого диагностирована таупатия, подозрение на ее наличие или риск возникновения таупатии, такой как болезнь Альцгеймера (AD) и/или любое другое нарушение, связанное с тау-белками. В терапевтических путях применения композиции, содержащие олигонуклеотиды по настоящему изобретению, вводят субъекту с подозрением на таупатию или уже страдающим таупатией, такой как AD и/или любое нарушение, связанное с таупатией, в количестве, достаточном для излечения или по меньшей мере частичного прерывания симптомов заболевания, включая его осложнения и промежуточные патологические фенотипы в развитии таупатии.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды по настоящему изобретению демонстрируют аффинность в отношении последовательностей cDNA тау-белка, включая экзонную и/или интронную области. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды по настоящему изобретению демонстрируют аффинность в отношении микроглиальных мишеней, таких как PLCG2, CD33, TREM2, или астроглиальных мишеней, таких как ApoE, а также в отношении других нейронных мишеней, таких как APP. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды по

настоящему изобретению демонстрируют аффинность в отношении по меньшей мере одной из следующих областей гена MART в таблице G.

Таблица G

Область	Целевые последовательности гена MART	Затрагиваемые тау-белки
Экзон 5	CTCGCATGGTCAGTAA AAGC	Все 8 изоформ: NP_058519.3, NP_005901.2, NP_058518.1, NP_058525.1, NP_001116539.1, NP_00116538.2, NP_001190180.1, NP_001190181.1
Экзон 5	GGAAGCGATGACAAAA AAGC	Все 8 изоформ: NP_058519.3, NP_005901.2, NP_058518.1, NP_058525.1, NP_001116539.1, NP_00116538.2, NP_001190180.1, NP_001190181.1
Экзон 10	GGCTCAAAGGATAATA TCAA	Все 8 изоформ: NP_058519.3, NP_005901.2, NP_058518.1, NP_058525.1, NP_001116539.1, NP_00116538.2, NP_001190180.1, NP_001190181.1
Экзон 12	GGTCCCTGGACAATATC ACC	Все 8 изоформ: NP_058519.3, NP_005901.2, NP_058518.1, NP_058525.1, NP_001116539.1, NP_00116538.2, NP_001190180.1, NP_001190181.1

[0146] В одном варианте осуществления нуклеотиды по настоящему изобретению демонстрируют аффинность в отношении экзона 10 или экзона 12 mRNA тау-белка.

[0147] В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или уменьшения тяжести симптомов заболевания, нарушения или состояния, такого как таупатия, у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающему введение субъекту фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

[0148] В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к способу уменьшения патологической агрегации тау-белка или распространения таупатии у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающему введение субъекту фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

[0149] В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество олигонуклеотида по настоящему изобретению. Как используется в данном документе со

ссылкой на олигонуклеотиды по настоящему изобретению, терапевтически эффективное количество означает количество олигонуклеотидов по настоящему изобретению, которое приводит к лечению заболевания, нарушения или состояния; предупреждает или замедляет прогрессирование заболевания, нарушения или состояния; или уменьшает или полностью уменьшает интенсивность симптомов, ассоциированных с иммунным заболеванием, нарушением или состоянием.

[0150] В соответствии с конкретными вариантами осуществления терапевтически эффективное количество относится к количеству терапевтического средства, которое достаточно для достижения одного, двух, трех, четырех или больше из следующих эффектов: (i) уменьшение или облегчение тяжести заболевания, нарушения или состояния, подлежащих лечению, или ассоциированного с ними симптома; (ii) сокращение продолжительности заболевания, нарушения или состояния, подлежащих лечению, или ассоциированного с ними симптома; (iii) предупреждение прогрессирования заболевания, нарушения или состояния, подлежащих лечению, или ассоциированного с ними симптома; (iv) обуславливание регресса заболевания, нарушения или состояния, подлежащих лечению, или ассоциированного с ними симптома; (v) предупреждение развития или начала заболевания, нарушения или состояния, подлежащих лечению, или ассоциированного с ними симптома; (vi) предотвращение рецидива заболевания, нарушения или состояния, подлежащих лечению, или ассоциированного с ними симптома; (vii) уменьшение количества госпитализаций субъекта, у которого имеется заболевание, нарушение или состояние, подлежащие лечению, или ассоциированный с ними симптом; (viii) уменьшение продолжительности госпитализации субъекта, у которого имеется заболевание, нарушение или состояние, подлежащие лечению, или ассоциированный с ними симптом; (ix) увеличение выживаемости субъекта с заболеванием, нарушением или состоянием, подлежащими лечению, или ассоциированным с ними симптомом; (xi) подавление или уменьшение интенсивности заболевания, нарушения или состояния, подлежащих лечению, или ассоциированного с ними симптома у субъекта; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического(-их) или терапевтического(-их) эффекта(-ов) от другой терапии.

[0151] В соответствии с конкретными вариантами осуществления заболевание, нарушение или состояние, подлежащие лечению, представляет собой таупатию. В соответствии с более конкретными вариантами осуществления заболевание, нарушение или состояние, подлежащие лечению, включает без ограничения наследственную болезнь Альцгеймера, спорадическую болезнь Альцгеймера, лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, связанную с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующий надъядерный паралич, кортикобазальную дегенерацию, болезнь Пика, прогрессирующий подкорковый глиоз, деменцию, характеризующуюся только клубками, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, деменцию, характеризующуюся появлением аргирофильных зерен, комплекс боковой амиотрофический склероз-паркинсонизм-деменция, синдром Дауна, болезнь Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, болезнь Галлервордена-Шпатца,

миозит с включенными тельцами, болезнь Крейтцфельдта-Якоба, мультисистемную атрофию, болезнь Ниманна-Пика типа С, церебральную амилоидную ангиопатию, обусловленную белками-прионами, подострый склерозирующий лейкоэнцефалит, миотоническую дистрофию, негуамскую болезнь двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитический паркинсонизм, хроническую травматическую энцефалопатию или деменцию боксеров (болезнь боксеров).

[0152] Поведенческий фенотип, связанный с таупатией, включает без ограничения когнитивные нарушения, ранее изменение личности и расторможенность, апатию, абулию, мутизм, апраксию, персеверацию, стереотипные движения/стереотипное поведение, гиперорализм, неорганизованность, неспособность планировать или организовывать последовательные задания, эгоизм/бесчувственность, антисоциальные черты, отсутствие эмпатии, запинание, неграмотную речь с частыми инверсионными ошибками, но относительно сохранившимся пониманием, нарушение понимания и нехватку словарного запаса, медленно прогрессирующую нестабильность походки, ретропульсию, замирание, частое падение, аксиальную ригидность, нечувствительную к леводопе, надъядерный паралич взора, подергивания глазных яблок с прямоугольным сигналом, медленные вертикальные саккады, псевдобульбарный синдром, апраксию конечностей, дистонию, потерю кортикальной чувствительности и тремор.

[0153] Пациенты, подлежащие лечению, включают без ограничения индивидуумов, у которых не наблюдаются симптомы, с риском возникновения AD или другой таупатии, а также пациентов, у которых в настоящее время проявляются симптомы. Пациенты, подлежащие лечению, включают индивидуумов с известным генетически обусловленным риском возникновения AD, таким как семейный анамнез AD или присутствие генетических факторов риска в геноме. Иллюстративными факторами риска являются мутации в белке-предшественнике амилоида (APP), особенно в положении 717 и положениях 670 и 671 (мутации Hardy и Swedish, соответственно). Другими факторами риска являются мутации в генах пресенилина, PS1 и PS2 и в ApoE4, семейный анамнез гиперхолестеринемии или атеросклероза. Индивидуумов, которые в настоящее время страдают AD, можно отличить от индивидуумов с типичной деменцией по наличию факторов риска, описанных выше. Кроме того, доступен ряд диагностических тестов для выявления индивидуумов с AD. Они включают измерение уровней тау-белка и Abeta 42 в спинномозговой жидкости. Повышенные уровни тау-белка и пониженные уровни Abeta 42 означают наличие AD. Индивидуумов, страдающих AD, можно также диагностировать посредством критериев Ассоциации AD и родственных заболеваний.

[0154] Олигонуклеотиды по настоящему изобретению пригодны и как терапевтические, и как профилактические средства для лечения или предупреждения нейродегенеративных заболеваний, которые предполагают накопление тау-белка и/или патологическую агрегацию тау-белка, таких как AD, или другие таупатии. У пациентов, у которых не наблюдаются симптомы, лечение можно начинать в любом возрасте (например, в возрасте приблизительно 10, 15, 20, 25, 30 лет). Как правило, однако, не

обязательно начинать лечение до тех пор, пациент не достигнет приблизительно 40, 50, 60 или 70 лет. Лечение обычно предусматривает многократные дозы в течение некоторого периода времени.

[0155] При применении в профилактических целях фармацевтические композиции или лекарственные препараты вводятся пациенту, предрасположенному к AD, или, в ином случае, с риском его развития, в количестве, достаточном для устранения или уменьшения риска, уменьшения тяжести или отсрочки начала заболевания, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания, его осложнения и промежуточные патологические фенотипы, которые проявляются в ходе развития заболевания. При применении в терапевтических целях композиции или лекарственные препараты вводятся пациенту с подозрением на такое заболевание или пациенту, уже страдающему ним, в количестве, достаточном для уменьшения, приостановки или отсрочки любых симптомов заболевания (биохимических, гистологических и/или поведенческих). Введение терапевтического средства может уменьшить или устранить умеренное когнитивное нарушение у пациентов, у которых еще не развилась патология, характерная для болезни Альцгеймера.

[0156] Терапевтически эффективное количество или дозировка могут варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как заболевание, нарушение или состояние, подлежащие лечению, способы введения, целевой участок, физиологическое состояние субъекта (включая, например, возраст, вес тела, состояние здоровья), того, является ли субъект человеком или животным, того, вводятся ли другие лекарства и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Для оптимизации безопасности и эффективности подбирают оптимальные лечебные дозы.

[0157] Олигонуклеотиды по настоящему изобретению могут быть получены в виде фармацевтических композиций, содержащих терапевтически эффективное количество олигонуклеотидов по настоящему изобретению в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Такой носитель может представлять собой жидкости, такие как вода и масла, включая масла, полученные из нефти, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Например, можно использовать 0,4% солевой раствор и 0,3% глицин. Эти растворы являются стерильными и, как правило, не содержат твердых частиц. Они могут быть стерилизованы с помощью обычных, хорошо известных методик стерилизации (например, фильтрации). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, которые необходимы для приблизительного соответствия физиологическим условиям, например, для доведения pH, и буферные средства, стабилизирующие, загущающие, смазывающие и красящие средства и т. д. Концентрация олигонуклеотидов по настоящему изобретению в таком фармацевтическом составе может варьироваться в широком диапазоне, т. е. от менее чем приблизительно 0,5%, обычно приблизительно 1% или по меньшей мере приблизительно 1%, вплоть до 15 или 20% по весу, и при этом она будет выбрана, в первую очередь,

исходя из требуемой дозы, значений объема жидкости, значений вязкости и т. д., в зависимости от конкретного выбранного способа введения.

[0158] Способ введения для терапевтического применения олигонуклеотидов по настоящему изобретению может представлять собой любой подходящий путь, с помощью которого средство доставляют хозяину. Например, композиции, описанные в данном документе, могут быть составлены так, чтобы быть подходящими для парентерального введения, например, внутривенного, подкожного, интраназального или внутримышечного, интраперитонеального, внутривенного, подкожного, интраназального или внутривенного введения, или их можно вводить в спинномозговую жидкость головного мозга или спинного мозга.

[0159] В некоторых вариантах осуществления инъекционный состав в соответствии с настоящим изобретением можно вводить непосредственно в центральную нервную систему (ЦНС). Согласно данному документу термин "центральная нервная система" определяется как часть нервной системы, которая у позвоночных состоит из головного и спинного мозга, к которой передаются сенсорные импульсы и от которой исходят двигательные импульсы, и которая координирует деятельность всей нервной системы.

[0160] Примеры непосредственного введения в ЦНС включают интратекальное (IT) введение и непосредственное введение в головной мозг, как например, с помощью интрацеребрального (IC), внутривентрикулярного, интрацеребровентрикулярного (ICV), внутривентрикулярного или субдурального путей введения. Такие пути введения могут быть особенно полезными при заболеваниях, поражающих центральную нервную систему.

[0161] Таким образом, в определенных аспектах и вариантах осуществления настоящего изобретения несистемное введение выбрано из группы, состоящей из интратекального, интрацеребрального, интравентрикулярного, интрацеребровентрикулярного, внутривентрикулярного и субдурального введения.

[0162] В некоторых вариантах осуществления несистемное введение согласно данному документу определено как интратекальное введение. Как известно специалисту в данной области техники, термин "интратекальное введение" относится к введению терапевтического вещества путем инъекции в субарахноидальное пространство спинного мозга, минуя гематоэнцефалический барьер.

[0163] В других вариантах осуществления несистемное введение согласно данному документу определено как интрацеребровентрикулярное введение.

[0164] Как известно из уровня техники, вентрикулярная система представляет собой набор из четырех взаимосвязанных полостей (желудочков) в головном мозге, где вырабатывается спинномозговая жидкость (CSF). Внутри каждого желудочка есть область сосудистого сплетения, сеть эндимальных клеток, участвующих в продуцировании CSF. Вентрикулярная система является продолжением центрального канала спинного мозга, обеспечивая возможность циркулировать потоку CSF.

[0165] Несмотря на защитную роль, которую гематоэнцефалический барьер играет в защите мозга, он ограничивает доступ к центральной нервной системе (ЦНС) потенциальных терапевтических средств, предназначенных для нейродегенеративных

расстройств. Нейродегенеративные заболевания, такие как без ограничения болезнь Альцгеймера, могут значительно облегчаться от введения терапевтических средств непосредственно в ЦНС. Одним из непосредственных путей введения в ЦНС является инъекция непосредственно в боковые желудочки мозга посредством интрацеребровентрикулярного введения, что приводит к доставке материалов в ЦНС через спинномозговую жидкость.

[0166] Таким образом, как известно из уровня техники и как используется в данном документе, термин "интрацеребровентрикулярное введение" относится к инъекции непосредственно в боковые желудочки мозга.

[0167] Термин "инъекция" или "инъекционный", используемые в данном документе, относятся к болюсной инъекции (введение дискретного количества средства для повышения его концентрации в физиологической жидкости), медленной болюсной инъекции в течение нескольких минут, или длительной инфузии, или более последовательным инъекциям/инфузиям, которые делают через определенные промежутки времени.

[0168] Лечение можно проводить в режиме введения с одной дозой или в режиме введения с несколькими дозами, при котором исходный курс лечения может состоять из 1-10 отдельных доз, с последующими другими дозами, вводимыми в последующие временные интервалы, которые необходимы для поддержания и/или усиления ответа, например, через 1-4 месяца вводят вторую дозу и, при необходимости, последующую(-ие) дозу(-ы) через несколько месяцев. Примеры приемлемых режимов лечения включают: (i) 0, 1 месяц и 6 месяцев, (ii) 0, 7 дней и 1 месяц, (iii) 0 и 1 месяц, (iv) 0 и 6 месяцев или другие режимы, достаточные для получения необходимых ответов, которые, как ожидается, приведут к уменьшению симптомов заболевания или уменьшению тяжести заболевания.

[0169] В соответствии с конкретными вариантами осуществления композиция, применяемая для лечения таупатии, может использоваться в комбинации с другими средствами, которые эффективны для лечения родственных нейродегенеративных заболеваний. В случае AD олигонуклеотиды по настоящему изобретению можно вводить в комбинации со средствами, которые уменьшают или предотвращают отложение бета-амилоида (Abeta). Возможно, что патологии, связанные с PNF-тау-белком и Abeta, являются синергичными. Таким образом, комбинированная терапия, нацеленная на устранение патологий, связанных как с PNF-тау-белком и Abeta, так и с Abeta одновременно, может быть более эффективна, чем целенаправленное воздействие на каждую из них по отдельности. В случае болезни Паркинсона и родственных нейродегенеративных заболеваний также возникает способ терапии путем иммуномодуляции для устранения агрегированных форм белка альфа-синуклеина. Комбинированная терапия, которая нацелена на устранение как тау-белков, так и белков альфа-синуклеина одновременно, может быть более эффективной, чем целенаправленное воздействие на каждый белок по отдельности.

[0170] В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей олигонуклеотид по настоящему изобретению, предусматривающему объединение олигонуклеотида с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

[0171] В некоторых вариантах осуществления у субъектов, которых лечили олигонуклеотидной композицией по настоящему изобретению, будет наблюдаться уменьшение интенсивности или устранение одного или более из следующих состояний или симптомов: наследственной болезни Альцгеймера, спорадической болезни Альцгеймера, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего надъядерного паралича, кортикобазальной дегенерации, болезни Пика, прогрессирующего подкоркового глиоза, деменции, характеризующейся только клубками, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции, характеризующейся появлением аргирофильных зерен, комплекса боковой амиотрофической склероз-паркинсонизм-деменция, синдрома Дауна, болезни Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, болезни Галлервордена-Шпатца, миозита с включенными тельцами, болезни Крейтцфельда-Якоба, мультисистемной атрофии, болезни Ниманна-Пика типа С, церебральной амилоидной ангиопатии, обусловленной белками-прионами, подострого склерозирующего лейкоэнцефалита, миотонической дистрофии, негуамской болезни двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитического паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и деменции боксеров (болезни боксеров).

[0172] В некоторых вариантах осуществления субъекты, которые получали лечение с помощью олигонуклеотидной композиции по настоящему изобретению, будут демонстрировать снижение уровней экспрессии одного или более биомаркеров, выбранных из тау-белка и mRNA MAPT по сравнению с субъектами, не получавшими лечение, страдающими таупатией, такой как AD и/или любое другое нарушение, ассоциированное с тау-белками.

[0173] Настоящее изобретение предусматривает способ лечения субъекта, у которого диагностирована таупатия или есть подозрение на ее наличие, такая как AD и/или любое другое нарушение, ассоциированное с тау-белками, включающий введение субъекту эффективного количества олигонуклеотидной композиции по настоящему изобретению.

[0174] Олигонуклеотиды и композиции по настоящему изобретению можно применять в антисмысловой терапии. Например, олигонуклеотид может содержать последовательность нуклеиновых оснований, которая комплементарна целевой последовательности нуклеиновой кислоты известной последовательности ДНК или РНК, участвующей в процессах при AD, или гибридизируется с ней, такой как по меньшей мере часть гена MAPT.

[0175] Некоторые варианты осуществления предусматривают способ модулирования экспрессии мишени путем приведения в контакт целевой нуклеиновой

кислоты с антисмысловым соединением, содержащим олигонуклеотид по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления целевая нуклеиновая кислота находится в клетке, например в организме животного, такого как человек.

[0176] Некоторые варианты осуществления предусматривают способ подавления экспрессии гена MАРТ у животного, включающий введение животному антисмыслового соединения, содержащего олигонуклеотид по настоящему изобретению. Олигонуклеотид может быть комплементарным или гибридизироваться с частью гена MАРТ.

[0177] Некоторые варианты осуществления предусматривают способ снижения экспрессии mRNA тау-белка или уровней тау-белка у субъекта с AD, включающий введение терапевтически эффективного количества олигонуклеотида или композиции по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом, снижая тем самым экспрессию mRNA тау-белка или уровни тау-белка у субъекта. Олигонуклеотид может быть комплементарным или гибридизироваться с частью целевой РНК, участвующей в экспрессии mRNA тау-белка, такой как mRNA MАРТ.

[0178] Олигонуклеотиды и композиции по настоящему изобретению можно применять, например, для ингибирования или снижения экспрессии тау-белка или гена MАРТ, или ингибирования транскрипции или трансляции тау-белка или MАРТ для лечения субъекта, у которого имеется AD, или для снижения уровней тау-белка или MАРТ у субъекта, у которого имеется или диагностирована AD. В вариантах осуществления раскрытые химерные олигонуклеотиды используются для индукции активности РНКазы Н в целевом гене, таком как ген MАРТ.

[0179] Настоящее изобретение также направлено на способы стабилизации олигонуклеотида для доставки субъекту. Стабилизация олигонуклеотида характеризуется [количественно] в данном документе как повышение точки плавления или температуры T_m олигонуклеотида.

[0180] Раскрытые олигонуклеотидные конструкции можно вводить отдельно или в комбинации с одним или более дополнительными средствами лечения целевого заболевания. Раскрытые олигонуклеотидные конструкции можно вводить отдельно или в комбинации с одним или более дополнительными средствами для лечения AD. В видах комбинированной терапии олигонуклеотидные конструкции и одно или более дополнительных средств для лечения AD можно вводить одновременно в одной и той же композиции или отдельных композициях, или вводить отдельно, в одно и то же время, или последовательно.

[0181] В некоторых вариантах осуществления раскрытые олигонуклеотидные конструкции вводят в комбинации с ингибиторами транскрипции или трансляции тау-белка или MАРТ или в режимах, которые объединяют олигонуклеотидные средства против AD с ингибиторами транскрипции или трансляции тау-белка или MАРТ. В вариантах осуществления описанные олигонуклеотидные конструкции вводят в сочетании со стандартным лечением для таупатий, таких как AD. Стандартное лечение для таупатий, таких как AD, может предусматривать ингибиторы ацетилхолинэстеразы, модуляторы

рецепторов NMDA, ингибиторы BACE, ингибиторы агрегации белков, антитела к тау-белку, антитела к Abeta, вакцинацию против тау-белка, вакцинацию против Abeta и другие известные методы лечения таупатий. В вариантах осуществления раскрытые олигонуклеотидные конструкции вводят в комбинации с одним или более олигонуклеотидами после либо одновременного (совместное введение), либо последовательного введения доз. Олигонуклеотиды могут включать олигонуклеотиды siRNA, антисмысловые олигонуклеотиды, такие как Tau^{ASO-12} (Devos et al., Sci Transl Med. 2017 January 25; 9(374)), имитаторы или ингибиторы miRNA, аптамеры, стерические блокаторы, saRNA, shRNA и/или иммуномодулирующие олигонуклеотиды.

[0182] Некоторые варианты осуществления предусматривают ингибирование экспрессии гена MAPT в клетке или у субъекта, включающее приведение клетки в контакт с олигонуклеотидом или композицией по настоящему изобретению или введение терапевтически эффективного количества олигонуклеотида или композиции по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

[0183] Некоторые варианты осуществления предусматривают лечение заболевания или нарушения, связанного с экспрессией или активностью гена MAPT, включающее введение терапевтически эффективного количества олигонуклеотида или композиции по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

[0184] Некоторые варианты осуществления предусматривают способ снижения экспрессии или уровней тау-белка при таупатии, такой как болезнь Альцгеймера (AD), у субъекта, у которого имеется таупатия, включающий введение терапевтически эффективного количества олигонуклеотида или композиции по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом, тем самым экспрессию mRNA тау-белка или уровни тау-белка у субъекта.

[0185] Некоторые варианты осуществления предусматривают способ снижения экспрессии mRNA MAPT или уровней белка MAPT при таупатии, такой как болезнь Альцгеймера (AD), у субъекта, у которого имеется таупатия, включающий введение терапевтически эффективного количества олигонуклеотида или композиции по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом, снижая тем самым экспрессию mRNA MAPT или уровни белка MAPT у субъекта.

[0186] В одном варианте осуществления олигонуклеотид или композицию по настоящему изобретению, нацеленную на MAPT, вводят субъекту, у которого имеется таупатия, такая как болезнь Альцгеймера, и/или любое нарушение, связанное с таупатией, так, чтобы экспрессия гена MAPT и/или уровень тау-белка, например, в клетке, ткани, крови или другой ткани или жидкости субъекта, снижались на по меньшей мере приблизительно 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 62%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 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% или по меньшей

мере приблизительно 99% или больше или на величину, равную значению между двумя из этих чисел, при введении субъекту олигонуклеотида или композиции по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления уровни тау-белка снижены на ранее указанное количество. В некоторых вариантах осуществления экспрессия одного или более генов, включая ген МАРТ, снижена на ранее указанную величину.

[0187] Введение олигонуклеотида или композиции по настоящему изобретению в соответствии со способами и путями применения, указанными в настоящем изобретении, может привести к снижению тяжести, признаков, симптомов и/или маркеров таких заболеваний или расстройств у пациента с таупатией, такой как болезнь Альцгеймера и/или любое нарушение, связанное с таупатией. Под "снижением" в данном контексте подразумевается статистически значимое снижение такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, или приблизительно 100%, или составлять величину, равную значению между двумя из этих чисел.

[0188] Количество олигонуклеотида или композиции по настоящему изобретению может быть определено специалистом в области медицины. Суточная доза продуктов может варьировать в широком диапазоне от 0,001 до 1000 мг на взрослого человека в день или в любом диапазоне в пределах вышеуказанного. Для ИТ или ICV введения композиции предпочтительно предоставлены в форме суспензий, содержащих 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 150, 200, 250 и 500 миллиграмм активного ингредиента для симптоматического регулирования дозировки у пациента, подлежащего лечению. Эффективное количество лекарственного средства, как правило, вводят при уровне дозировки от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг веса тела в сутки или в любом диапазоне в пределах вышеуказанного. Предпочтительно, диапазон составляет от приблизительно 0,01 до приблизительно 50,0 мг/кг веса тела в день или любой диапазон в пределах вышеуказанного. Более предпочтительно, от приблизительно 0,01 до приблизительно 10,0 мг/кг веса тела в день или в любом диапазоне в пределах вышеуказанного. Более предпочтительно, от приблизительно 0,01 до приблизительно 1,0 мг/кг веса тела в день или в любом диапазоне в пределах вышеуказанного. Олигонуклеотиды можно вводить в режиме 1-4 раза в сутки. Например, олигонуклеотиды по настоящему изобретению можно вводить в одной или более дозах, составляющих от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг. Например, раскрытые олигонуклеотиды можно вводить в дозе, составляющей приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29,

29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или приблизительно 100 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также предназначены для включения в настоящее изобретение. Эти значения могут применяться к интратекальной или интрацеребровентрикулярной доставке. В этих дозах также можно вводить другие формы доставки, описанные в данном документе. Дозировки могут варьироваться в зависимости от требования пациентов, тяжести состояния, лечение которого осуществляют, и используемых олигонуклеотидов. Можно применять либо суточное введение, либо постпериодическое дозирование.

[0189] Олигонуклеотиды по настоящему изобретению можно вводить с помощью интратекальной или интрацеребровентрикулярной инфузии в течение периода времени, такого как в течение 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или приблизительно 25 минут. Введение можно повторять, например, на регулярной основе, например, еженедельно, раз в две недели (т. е. каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или дольше. После начального режима лечения средства лечения можно вводить менее часто. Например, после введения еженедельно или раз в две недели в течение трех месяцев введение можно повторять один раз в месяц, в течение шести месяцев, года или дольше.

[0190] Эффективность лечения или предупреждения заболевания можно оценить, например, путем измерения прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, тяжести симптомов, когнитивных показателей, уменьшения боли, качества жизни, дозы лекарства, необходимой для поддержания лечебного эффекта, уровня маркера заболевания или любого другого измеримого параметра, подходящего для данного заболевания, которое подлежит лечению или предназначено для предупреждения. Специалист в данной области техники вполне может контролировать эффективность лечения или предупреждения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. Например, эффективность лечения таупатии, такой как AD, может быть оценена, например, путем периодического контроля экспрессии гена MАРТ и/или уровней тау-белка. Сравнение более поздних показаний с первоначальными показаниями дает представление о том, было ли лечение эффективным.

4. Определения

[0191] Следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, служит лишь для цели описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения. Если не указано иное, то будут использоваться следующие определения.

[0192] Используемые в данном документе термины "комплементарный" или "комплементарность", используемые в данном документе по отношению к полинуклеотидам (т. е. последовательностям нуклеотидов, таких как олигонуклеотид или целевая нуклеиновая кислота), относятся к правилам спаривания оснований. Комплемент последовательности нуклеиновой кислоты, используемый в данном документе, относится

к олигонуклеотиду, который при выравнивании с последовательностью нуклеиновой кислоты так, чтобы 5'-конец одной последовательности был спарен с 3'-концом другой, находится в "антипараллельной ассоциации". Например, последовательность "5'-A-G-T-3'" комплементарна последовательности "3'-T-C-A-5'". Определенные основания, которые обычно не встречаются во встречающихся в природе нуклеиновых кислотах, могут быть включены в нуклеиновые кислоты, описанные в данном документе. Они включают, например, инозин, 7-дезазагуанин, заблокированные нуклеиновые кислоты (LNA) и пептидные нуклеиновые кислоты (PNA). Комплементарность не обязательно должна быть идеальной; стабильные дуплексы могут содержать несовпадающие пары оснований, дегенеративные или несовпадающие основания. Специалисты в области технологии нуклеиновых кислот могут определить стабильность дуплекса эмпирически с учетом ряда переменных, включая, например, длину олигонуклеотида, состав оснований и последовательность олигонуклеотида, ионную силу и частоту несовпадения пар оснований. Последовательность комплемента также может являться последовательностью РНК, комплементарной последовательности ДНК или ее комплементу, а также может являться cDNA.

[0193] Используемый в данном документе термин "гибридизация" относится к процессу, где две по существу комплементарные нити нуклеиновой кислоты (комплементарные на по меньшей мере приблизительно 65% на протяжении участка из по меньшей мере 14-25 нуклеотидов, комплементарные на по меньшей мере приблизительно 75% или по меньшей мере приблизительно 90%) подвергаются отжигу друг с другом в подходящих жестких условиях с образованием дуплекса или гетеродуплекса посредством образования водородных связей между комплементарными парами оснований. Гибридизацию обычно и предпочтительно проводят с зондом длиной в несколько молекул нуклеиновой кислоты, предпочтительно длиной 15-100 нуклеотидов, более предпочтительно длиной 18-50 нуклеотидов. Методики гибридизации нуклеиновых кислот хорошо известны из уровня техники. См., например., Sambrook, et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. Гибридизация и сила гибридизации (т. е. сила связи между нуклеиновыми кислотами) зависит от таких факторов, как степень комплементарности между нуклеиновыми кислотами, жесткость используемых условий и температура плавления (T_m) образованного гибрида. Специалисты в данной области техники понимают как оценивать и регулировать жесткость условий гибридизации таким образом, что последовательности, имеющие по меньшей мере необходимый уровень комплементарности, будут стабильно гибридизироваться, а последовательности с более низким уровнем комплементарности - не будут. Например, в отношении условий и параметров гибридизации см., например, Sambrook, et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.; Ausubel, F. M. et al. 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Secaucus, N.J. В некоторых вариантах осуществления специфическая гибридизация происходит в жестких

условиях гибридизации. Олигонуклеотид или полинуклеотид (например, зонд или праймер), специфический в отношении целевой нуклеиновой кислоты, будет "гибридизоваться" с целевой нуклеиновой кислотой в подходящих условиях.

[0194] Используемый в данном документе термин "строгие условия гибридизации" относится к условиям гибридизации, по меньшей мере столь же строгим, как следующие: гибридизация в 50% формамиде, 5x SSC, 50 mM NaH_2PO_4 , pH 6,8, 0,5% SDS, 0,1 мг/мл обработанной ультразвуком ДНК из молок лососевых и 5x раствор Денхарта при 42°C в течение ночи; промывание 2x SSC, 0,1% SDS при 45°C; и промывание 0,2x SSC, 0,1% SDS при 45°C. В другом примере строгие условия гибридизации не должны допускать гибридизацию двух нуклеиновых кислот, которые отличаются на участке из 20 смежных нуклеотидов более чем на два основания.

[0195] Используемый в данном документе термин "по существу комплементарный" означает, что две последовательности гибридизируются в жестких условиях гибридизации. Квалифицированный специалист поймет, что по существу комплементарные последовательности не обязательно гибридизируются по всей своей длине. В частности, по существу комплементарные последовательности могут предусматривать непрерывную последовательность оснований, которая не гибридизируется с целевой последовательностью, расположенную на 3'- или 5'-конце относительно непрерывной последовательности оснований, которые гибридизируются с целевой последовательностью в жестких условиях гибридизации.

[0196] Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый" относится к материалу, который не является нежелательным с биологической или иной точки зрения, т. е. материал может быть включен в фармацевтическую композицию, вводимую пациенту, не вызывая каких-либо нежелательных биологических эффектов или вредным образом взаимодействуя с любым из других компонентов композиции, в которой он содержится. Когда термин "фармацевтически приемлемый" используется для обозначения фармацевтического носителя или вспомогательного вещества, то подразумевается, что носитель или вспомогательное вещество соответствуют требуемым стандартам токсикологического и производственного тестирования, или что он включен в Руководство по неактивным ингредиентам, подготовленное Управлением США по надзору за качеством медикаментов.

[0197] Используемые в данном документе термины "конструкция" или "конструкции" олигонуклеотидов могут относиться к олигонуклеотиду по настоящему изобретению и, например, (1) конъюгированному фрагменту, такому как описанные в данном документе (например, нацеливающие фрагменты), или (2) доменам модифицированных/немодифицированных нуклеотидов, как например, в некоторых химерных олигонуклеотидах.

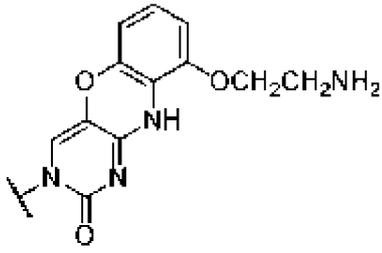
[0198] Используемый в данном документе термин "химерный олигонуклеотид" относится к олигонуклеотиду, имеющему более чем один домен, например, как проиллюстрировано формулами (VI) и (VII). Химерный олигонуклеотид может включать

дополнительные компоненты, например лиганд-нацеленную группу, или дополнительные нуклеотиды, линкеры и т. д.

[0199] Используемый в данном документе термин "модифицированный нуклеозид" относится к нуклеозиду, имеющему независимо модифицированный сахарный фрагмент и/или модифицированное нуклеиновое основание. Понятно, что нуклеозиды могут быть связаны посредством межсубъединичных связей, таких как фосфоэфирные межсубъединичные связи, тиофосфатные межсубъединичные связи, фосфорамидатные межсубъединичные связи и тиофосфорамидатные межсубъединичные связи. "Модифицированные нуклеотиды" могут относиться к нуклеозидам и межсубъединичной связи вместе.

[0200] Используемые в данном документе термины "немодифицированные" или "природные" нуклеиновые основания включают пуриновые основания аденин (A) и гуанин (G), а также пиримидиновые основания тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). "Модифицированные нуклеиновые основания" включают другие синтетические и природные нуклеиновые основания, такие как 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил и цитозин, 5-пропинил ($-C\equiv C-CH_3$), урацил и цитозин и другие алкильные производные пиримидиновых оснований, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген, 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген, в частности 5-бром, 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 2-F-аденин, 2-аминоаденин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-дезазагуанин и 7-дезааденин, а также 3-дезазагуанин и 3-дезааденин. Дополнительные модифицированные нуклеиновые основания включают трициклические пиримидины, такие как феноксазинцитидин (1H-пиримидо[5,4-b][1,4]бензоксазин-2(3H)-он), фенотиазинцитидин (1H-пиримидо[5,4-b][1,4]бензотиазин-2(3H)-он), G-фиксирующие основания, такие как замещенный феноксазинцитидин (например, 9-(2-аминоэтокси)-H-пиримидо[5,4-b][1,4]бензоксазин-2(3H)-он), карбазолцитидин (2H-пиримидо[4,5-b]индол-2-он), пиридоиндолцитидин (H-пиридо[3,2,5]пирроло[2,3-d]пиримидин-2-он). Модифицированные нуклеиновые основания могут также включать те, в которых пуриновое или пиримидиновое основание заменено другими гетероциклами, например 7-дезааденин, 7-дезазагуанозин, 2-аминопиридин и 2-пиридон.

[0201] В некоторых вариантах осуществления модифицированное нуклеиновое основание выбрано из группы, состоящей из 5-метилцитозина, 2,6-диаминопурина, 5-метилурацила и g-фиксирующего основания. В некоторых вариантах осуществления g-фиксирующее основание представляет собой



[0202] Используемые в данном документе термины "лиганд-нацеленная группа" или "нацеливающийся фрагмент" относятся к фрагменту, который способствует доставке олигонуклеотида к клеткам, вовлеченным в процессы при таупатии, усиливая клеточное поглощение или улучшая фармакокинетику, включая биодоступность олигонуклеотида по отношению к его целевой последовательности. Эти группы включают лиганды, нацеливающиеся на рецепторы, которые нацелены на рецепторы на поверхности клеток.

[0203] Используемый в данном документе термин "конформационно ограниченный нуклеозид" относится к нуклеозидам, имеющим мостиковую или бициклическую сахарную структуру, где конформация нуклеозида может быть фиксирована в конкретной конфигурации. Например, конформационно ограниченные нуклеозиды включают нуклеозиды с фиксированным изломом плоскости кольца сахара в конформации C_3' -эндо. Иллюстративные варианты осуществления предусматривают мостиковые нуклеиновые кислоты (BNA), например, нуклеозиды 2', 4'-BNA, такие как LNA α -L-метиленокси (4'-CH₂-O-2'), LNA β -D-метиленокси (4'-CH₂-O-2'), ENA этиленокси (4'-(CH₂)₂-O-2'), 2',4'-BNA^{NC}[NH], 2',4'-BNA^{NC}[NMe], 2',4'-BNA^{NC}[NBn], BNA аминокси(4'-CH₂-O-N(R)-2') и BNA оксиамино(4'-CH₂-N(R)-O-2'). Другие иллюстративные структуры BNA включают без ограничения олигонуклеотиды, имеющие по крайней мере один мостик между 4'- и 2'-положениями сахара, где каждый из мостиков независимо содержит 1 или от 2 до 4 связанных групп, независимо выбранных из - [C(R₁)(R₂)]_n-, -C(R₁)=C(R₂)-, -C(R₁)=N-, -C(=NR₁)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R₁)₂-, -S(=O)_x- и -N(R₁)-, где: x равно 0, 1 или 2; n равно 1, 2, 3 или 4; при этом каждый из R₁ и R₂ независимо представляет собой H, защитную группу, гидроксил, C₁-C₁₂алкил, замещенный C₁-C₁₂алкил, C₂-C₁₂алкенил, замещенный C₂-C₁₂алкенил, C₂-C₁₂алкинил, замещенный C₂-C₁₂алкинил, C₅-C₂₀арил, замещенный C₅-C₂₀арил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, гетероарил, замещенный гетероарил, C₅-C₇алициклический радикал, замещенный C₅-C₇алициклический радикал, галоген, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, COOJ₁, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, CN, сульфонил (S(=O)₂-J₁) или сульфоксил (S(=O)-J₁); и при этом каждый из J₁ и J₂ независимо представляет собой H, C₁-C₁₂алкил, замещенный C₁-C₁₂алкил, C₂-C₁₂алкенил, замещенный C₂-C₁₂алкенил, C₂-C₁₂алкинил, замещенный C₂-C₁₂алкинил, C₅-C₂₀арил, замещенный C₅-C₂₀арил, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, C₁-C₁₂аминоалкил, замещенный C₁-C₁₂аминоалкил или защитную группу. Некоторые BNA были получены и раскрыты в патентной литературе, а также в научной литературе (см., например: выданные патенты США №№ 7053207;

6268490; 6770748; 6794499; 7034133; 6525191; 7696345; 7569575; 7314923; 7217805; и 7084125, настоящим включенные в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. "Конформационно ограниченный нуклеотид" относится к конформационно ограниченным нуклеозидам, связанным межсубъединичной связью.

[0204] В некоторых вариантах осуществления конформационно ограниченный нуклеозид выбран из необязательно замещенной LNA или необязательно замещенной ENA. Необязательно замещенные LNA или ENA могут быть замещены алкильным фрагментом, например метилом или этилом, в одном из фрагментов $-CH_2-$.

[0205] Используемый в данном документе термин "экспрессия" относится к биосинтезу продукта гена. Термин охватывает транскрипцию гена в РНК. Термин также включает транскрипцию РНК в один или более полипептидов и дополнительно, охватывает все природные посттранскрипционные и посттрансляционные модификации. Олигонуклеотиды по настоящему изобретению могут находиться в цитоплазме клетки-хозяина, во внеклеточной среде, такой как среда для роста клеточной культуры, или быть заякоренными к клеточной мембране.

[0206] Используемый в данном документе термин "подавление экспрессии" относится к снижению или блокированию экспрессии или активности и не обязательно указывает на полное устранение экспрессии или активности.

[0207] Используемый в данном документе термин "снижение уровней белка" относится к снижению или блокаде транскрипции mRNA с образованием белка, кодируемого mRNA, и не обязательно указывает на полное устранение транскрипции mRNA или белка.

[0208] Используемый в данном документе термин "субъект" относится к млекопитающим и включает людей и млекопитающих, отличных от человека. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек, например взрослый человек.

[0209] Используемые в данном документе термины "tau" или "tau-белок" относятся к широко распространенному белку центральной и периферической нервной системы, имеющему множество изоформ. В центральной нервной системе человека (ЦНС) в результате альтернативного сплайсинга существует шесть основных изоформ tau-белка размером от 352 до 441 аминокислоты (Hanger et al., Trends Mol Med. 15:112-9, 2009). Эти изоформы отличаются одна от другой по подвергающемуся регуляции включению 0-2 N-концевых вставок и 3 или 4 tandemно расположенных повторов, связывающихся с микротрубочками, и при этом они упоминаются как 0N3R 1N3R 2N3R 0N4R 1N4R и 2N4R. Используемый в данном документе термин "контрольный tau-белок" относится к изоформе tau-белка, которая лишена фосфорилирования и других посттрансляционных модификаций. Используемый в данном документе термин "tau" включает белки, содержащие мутации, например точечные мутации, фрагменты, вставки, делеции и варианты сплайсинга полноразмерного tau-белка дикого типа. Термин "tau" также охватывает посттрансляционные модификации аминокислотной

последовательности тау-белка. Посттрансляционные модификации включают без ограничения фосфорилирование. Тау-белок связывает микротрубочки и регулирует транспортировку груза через клетки, процесс, который может модулироваться фосфорилированием тау-белка. При AD и родственных расстройствах аномальное фосфорилирование тау-белка является преобладающим, и считается, что оно предшествует и/или запускает агрегацию тау-белка в фибриллы, называемые парными спиральными филаментами (PHF). Основным компонентом PHF является гиперфосфорилированный тау-белок. Используемый в данном документе термин "парные спиральные филаменты-тау" или "PHF-тау" относится к агрегатам тау-белка в парных спиральных филаментах. При электронной микроскопии видны две основные области в структуре PHF: размытая оболочка и основной филамент; размытая оболочка, чувствительная к протеолизу и расположенная вне филаментов, и резистентные к протеазе основные филаменты, образующие основу PHF (Wischik et al. Proc Natl Acad Sci USA. 85:4884-8, 1988).

[0210] Используемый в данном документе термин "таупатия" охватывает любое нейродегенеративное заболевание, которое предполагает патологическую агрегацию тау-белка в пределах головного мозга. В дополнение к наследственной и спорадической AD, другими иллюстративными таупатиями являются лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанная с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующий надъядерный паралич, кортикобазальная дегенерация, болезнь Пика, прогрессирующий подкорковый глиоз, деменция, характеризующаяся только клубками, диффузные нейрофибрилярные клубки с кальцификацией, деменция, характеризующаяся появлением аргирофильных зерен, комплекс боковой амиотрофической склероз-паркинсонизм-деменция, синдром Дауна, болезнь Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, болезнь Галлервордена-Шпатца, миозит с включенными тельцами, болезнь Крейтцфельдта-Якоба, мультисистемная атрофия, болезнь Ниманна-Пика типа С, церебральная амилоидная ангиопатия, обусловленная белками-прионами, подострый склерозирующий лейкоэнцефалит, миотоническая дистрофия, негуамская болезнь двигательных нейронов с нейрофибрилярными клубками, постэнцефалитический паркинсонизм и хроническая травматическая энцефалопатия, такая как деменция боксеров (болезнь боксеров) (Morris et al., Neuron, 70:410-26, 2011).

[0211] Используемые в данном документе термины "лечить", "осуществление лечения" и "лечение" относятся к уменьшению интенсивности или купированию по меньшей мере одного измеряемого физического параметра, связанного с таупатией, который не обязательно проявляется у субъекта, однако может быть различим у субъекта. Термины "лечить", "осуществление лечения" и "лечение" также могут относиться к вызыванию регрессии, предупреждению прогрессирования или по меньшей мере замедлению прогрессирования заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины "лечить", "осуществление лечения" и "лечение" относятся к уменьшению интенсивности, предупреждению развития или начала или

сокращению продолжительности одного или более симптомов, ассоциированных с таупатией. В конкретном варианте осуществления термины "лечить", "осуществление лечения" и "лечение" относятся к предупреждению рецидива заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления термины "лечить", "осуществление лечения" и "лечение" относятся к увеличению выживаемости субъекта, страдающего заболеванием, нарушением или состоянием. В конкретном варианте осуществления термины "лечить", "осуществление лечения" и "лечение" относятся к устранению заболевания, нарушения или состояния у субъекта.

[0212] Используемый в данном документе термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству активного ингредиента или компонента, которое вызывает требуемый биологический или медицинский ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество может быть определено эмпирически и обычным образом в соответствии с заявленной целью. Например, анализы *in vitro* могут необязательно использоваться для определения оптимальных диапазонов дозировок. Выбор конкретной эффективной дозы может быть определен (например, посредством клинических испытаний) специалистами в данной области техники на основании рассмотрения нескольких факторов, включая заболевание, которое подлежит лечению или предупреждению, вовлеченные симптомы, массу тела пациента, состояние иммунитета пациента и другие факторы, известные специалисту в данной области техники. Точная доза для использования в составе также будет зависеть от пути введения и тяжести заболевания, и она должна быть определена в соответствии с заключением лечащего врача и обстоятельствами для каждого пациента. Эффективные дозы можно экстраполировать исходя из кривых доза-ответ, полученных из тест-систем *in vitro* или на животных моделях.

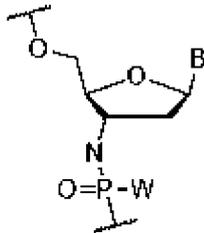
[0213] Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемая соль" означает физиологически и фармацевтически приемлемые соли соединений по настоящему изобретению, т. е. соли, которые сохраняют требуемую биологическую активность исходного олигонуклеотида/соединения и не придают им нежелательных токсикологических эффектов.

[0214] В настоящем изобретении используются следующие сокращения. Нуклеозиды 2'-Н (дезоксирибоза) обозначаются заглавной буквой, соответствующей нуклеиновому основанию, например, А, С, G и Т. Нуклеозиды 2'-ОН (рибоза) обозначаются строчной буквой *r* и заглавной буквой соответствующей нуклеиновому основанию, например, *rA*, *rC*, *rG* и *rU*. Нуклеозиды 2'-О-Ме обозначаются строчной буквой *m* и прописной буквой, соответствующей азотному основанию, например, *mA*, *mC*, *mG* и *mU*. Нуклеозиды 2'-МОЕ обозначаются строчным "moe" и прописной буквой, соответствующей нуклеиновому основанию, например, *moeA*, *moeC*, *moeG* и *moeU*. Нуклеозиды 2'-рибо-*F* обозначаются строчной буквой "f" и прописной буквой, соответствующей нуклеиновому основанию, например, *fA*, *fC*, *fG* и *fU*. Нуклеозиды 2'-арабино-*F* обозначаются строчным "af" и прописной буквой, соответствующей

нуклеиновому основанию, например, afA, afC, afG и afU. mA* представляет собой 3'-амино-2'-ОМе-2,6-диаминопурин. A* представляет собой 3'-амино-2'-дезоксиде-2,6-диаминопурин. fA* представляет собой 3'-амино-2'-F-2,6-диаминопурин. Нуклеозиды LNA обозначаются буквой "L" и прописной буквой, соответствующей нуклеиновому основанию, например, LA, LC, LG, LT.

[0215] Для основной цепи или межсубъединичных связей нуклеотидов фосфодизфирные межсубъединичные связи называются «PO» или обычно не включаются в информацию о последовательности; тиофосфатные межсубъединичные связи сокращенно обозначаются строчными буквами "ps"; фосфорамидатные межсубъединичные связи сокращенно обозначаются строчными буквами "pr"; и тиофосфорамидатные межсубъединичные связи сокращенно обозначаются строчными буквами "prs".

[0216] N3'→P5' относится к модифицированным нуклеотидам, имеющим межсубъединичные связи, где 3'-фрагмент содержит N (например, NH) и связан посредством P. Например, следующая структура характеризуется связью N3'→P5':



[0217] Следует отметить, что при использовании в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Кроме того, следует отметить, что формула изобретения может быть составлена так, чтобы исключить любой необязательный элемент. Как таковое, это заявление предназначено для использования в качестве предшествующей основы для использования такой исключительной терминологии, как "исключительно", "только" и т. п. в связи с перечислением элементов формулы изобретения или использованием "отрицательного" ограничения.

[0218] Термин "приблизительно" будет понятен специалистам в данной области техники и будет варьироваться в некоторой степени в зависимости от контекста, в котором он используется. Если есть варианты использования термина, которые не ясны специалистам в данной области техники с учетом контекста, в котором он используется, то "приблизительно" будет означать не более плюс или минус 10% от конкретного термина. Определенные диапазоны представлены в данном документе с числовыми значениями, которым предшествует термин "приблизительно". Термин "приблизительно" используется в данном документе для обеспечения буквальной поддержки точного числа, которому он предшествует, а также числа, которое близко или находится примерно возле числа, которому предшествует термин. При определении того, находится ли число близко или примерно с конкретно указанным числом, близкое или примерное неуказанное число

может являться числом, которое в контексте, в котором оно представлено, обеспечивает существенный эквивалент конкретно указанного числа.

[0219] Также следует принимать во внимание, что различные режимы лечения или предупреждения заболеваний или состояний, описанные в данном документе, предназначены для обозначения "существенного", что включает полное, но также и меньшее чем полное лечение или предупреждение, и при этом достигается некоторый соответствующий с биологической или медицинской точки зрения результат. Лечение может являться непрерывным пролонгированным лечением хронического заболевания, или однократным, или состоять из нескольких введений для лечения острого состояния.

[0220] Если предусмотрен диапазон значений, то подразумевается, что каждое промежуточное значение, вплоть до десятой единицы нижнего предела, если из контекста явно не следует иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим указанным или промежуточным значением в указанном диапазоне входит в объем настоящего изобретения. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут независимо включаться в меньшие диапазоны и также охвачены объемом изобретения с учетом любого специально исключенного ограничения в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, то диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также включены в настоящее изобретение.

[0221] Настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными вариантами осуществления, так как они могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена лишь для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

[0222] Как будет очевидно специалистам в данной области техники после прочтения данного раскрытия, каждый из отдельных вариантов осуществления, описанных и проиллюстрированных в данном документе, имеет дискретные компоненты и особенности, которые могут быть легко отделены или объединены с особенностями любого из нескольких других вариантов осуществления, без отступления от объема и сущности настоящего изобретения. Любой изложенный способ может осуществляться в порядке перечисления событий или в любом другом логически возможном порядке.

[0223] Все публикации и патенты, процитированные в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или патент были конкретно и по отдельности указаны для включения посредством ссылки и включены в данный документ посредством ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов в связи с теми, которые цитируются в публикациях. Цитирование любой публикации предназначено для ее раскрытия до даты подачи и не должно толковаться как признание того, что настоящее изобретение не имеет права датировать такую публикацию задним числом на основании предшествующего изобретения. Кроме того, указанные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, что может потребовать

независимого подтверждения.

5. Примеры

[0224] Следующие примеры иллюстрируют определенные варианты осуществления настоящего изобретения, чтобы помочь специалисту в данной области техники реализовать на практике настоящее изобретение. Соответственно, примеры никоим образом не рассматриваются как ограничивающие объем настоящего изобретения.

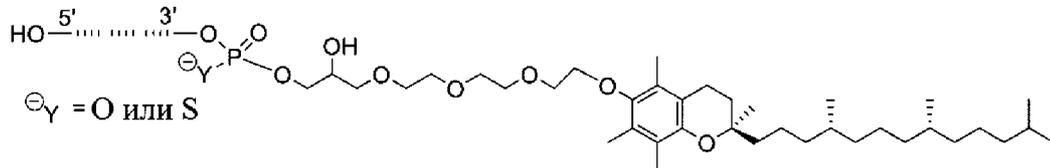
Способы получения

[0225] Все мономеры высушивали в вакуумном эксикаторе с помощью высушивающих средств (КОН и P_2O_5 , к. т., 24 ч.). Твердые подложки для синтеза (CPG), присоединенные к первому 5'-остатку, получали у коммерчески доступных источников. Все другие реагенты для синтеза и растворители получали у коммерчески доступных источников и применяли как таковые. Химические вещества и растворители для выполнения действий после синтеза приобретали у коммерчески доступных источников и применяли без какой-либо очистки или обработки. Растворитель (ацетонитрил) и растворы (амидит и активатор) хранили над молекулярными ситами в ходе синтеза.

[0226] Антисмысловые олигонуклеотиды синтезировали на установке для синтеза ABI-394 с применением стандартного 93-стадийного цикла, прописанного производителем. Твердая подложка представляла собой стекло с контролируемым размером пор, и мономеры содержали стандартные защитные группы. Каждый олигонуклеотид синтезировали отдельно с применением коммерчески доступных 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-О-(2-цианоэтил-N, N-диизопропил)-ДНК и/или 2'-О-Ме-фосфорамидитных мономеров 6-N-бензоиладенозина (A^{Bz}), 4-N-ацетилцитидина (C^{Ac}), 2-N-изобутирилгуанозина (G^{iBu}) и тимидина (Т) в соответствии со стандартными протоколами твердофазного синтеза олигонуклеотидов. Фосфорамидиты приобретали у коммерчески доступных источников. 2'-О-Ме-2,6-диаминопурин-фосфорамидит приобретали у коммерчески доступных источников. Для синтеза олигорибонуклеотидных фосфотиоатов применяли DDTT, ((диметиламинометилиден)амино)-3Н-1,2,4-дитиазолин-3-тион, как средство для переноса серы. Модифицированные олигонуклеотиды получали с применением проводимой в течение длительного времени реакции сочетания 0,1 М раствора фосфорамидита в CH_3CN в присутствии активатора, представляющего собой 5-(этилтио)-1Н-тетразол, со связанным с твердой подложкой олигонуклеотидом с последующими стандартным введением блокирующей группы, окислением и снятием защиты. Эффективность постадийного сочетания для всех модифицированных фосфорамидитов составляла более 98%. Несущие олигонуклеотид твердые подложки нагревали с водным раствором аммиака/этанола (3:1) при $55^\circ C$ в течение 8 ч. со снятием защиты с неустойчивых к воздействию оснований защитных групп.

[0227] Токоферол-конъюгированные олигонуклеотиды можно получать путем инициирования твердофазного синтеза на подложке с прикрепленным к TEG-линкеру токоферолом и конечного сочетания фосфорамидита со связанным с подложкой

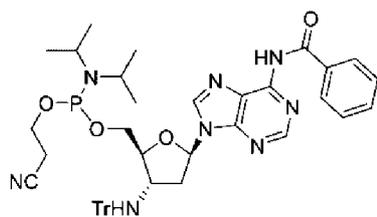
олигонуклеотидом. Токоферол-конъюгированные последовательности можно очищать посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) на упакованной RPC-Source15 в лаборатории колонке с обращенной фазой. Буферы могут представлять собой 20 mM NaOAc в 10% CH₃CN (буфер А) и 20 mM NaOAc в 70% CH₃CN (буфер В). С помощью аналитической HPLC и LC-MS с ES подтверждали целостность олигонуклеотидов.



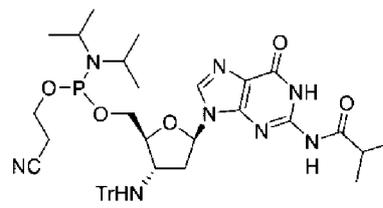
Витамин Е с TEG-линкером

Синтез модифицированных фосфорамидатом (NP) и тиофосфорамидатом (NPS) олигонуклеотидов

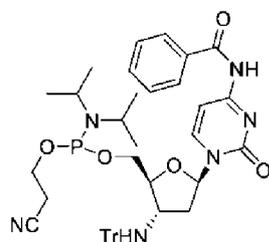
[0228] NP- и NPS-модифицированные олигонуклеотиды синтезировали на установке для синтеза ABI-394 с применением 93-стадийного цикла, прописанного с модификациями для стадий удаления блокирующих групп, сочетания и выдерживания. Твердая подложка представляла собой 3'-NHTr-5'-LCAA-CPG. Каждый олигонуклеотид синтезировали отдельно с применением 3'-NH-Tr-5'-O-(2-цианоэтил-N, N-диизопропил)-ДНК-фосфорамидитных мономеров 6-N-бензоиладенозина (A^{Bz}), 4-N-бензилцитидина (C^{Bz}), 2-N-изобутирилгуанозина (G^{iBu}) и тимидина (T) в соответствии со стандартными протоколами твердофазного синтеза с использованием фосфорамидитных химических структур с применением процедуры, описанной в *Nucleic Acids Research*, 1995, Vol. 23, No. 14 2661-2668.



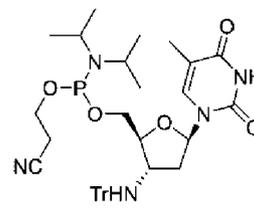
3'-NHTr-dA (Bz)



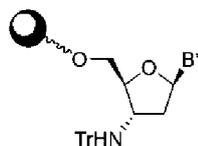
3'-NHTr-dG(iBu)



3'-NHTr-dC(Bz)



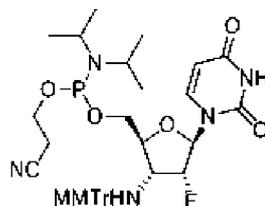
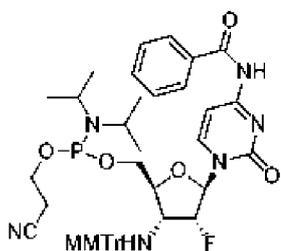
3'-NHTr-T:



B* = A, C, G или T

Структурные блоки 3'-NHTr-ДНК для синтеза олигомеров

[0229] Синтезировали 2'-F-3'-NH-MMT_r-5'-O-(2-цианоэтил-N, N-диизопропил)-уридиновые (U) и 4-N-бензоилцитидиновые (C^{Bz}) фосфорамидитные мономеры с применением процедуры, описанной в *Nucleic Acids Research*, 1996, Vol. 24, No. 15, **2966-**

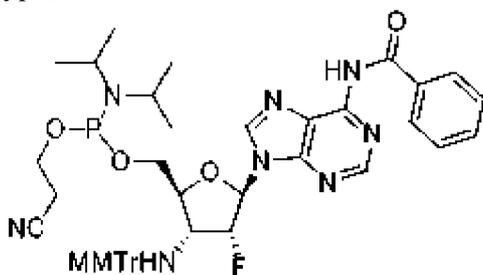


2973

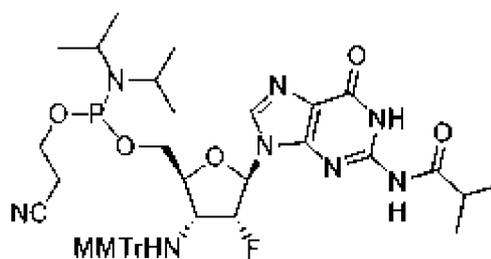
3'-NHMMTr-2'-F-C(Bz)

3'-NHMMTr-2'-F U:

[0230] 2'-F-3'-NH-MMT_r-5'-O-(2-цианоэтил-N, N-диизопропил)-6-N-бензоиладенозин (A^{Bz}), 2-N-изобутирилгуанозин (G^{iBu}), синтезировали согласно процедуре, описанной ниже.

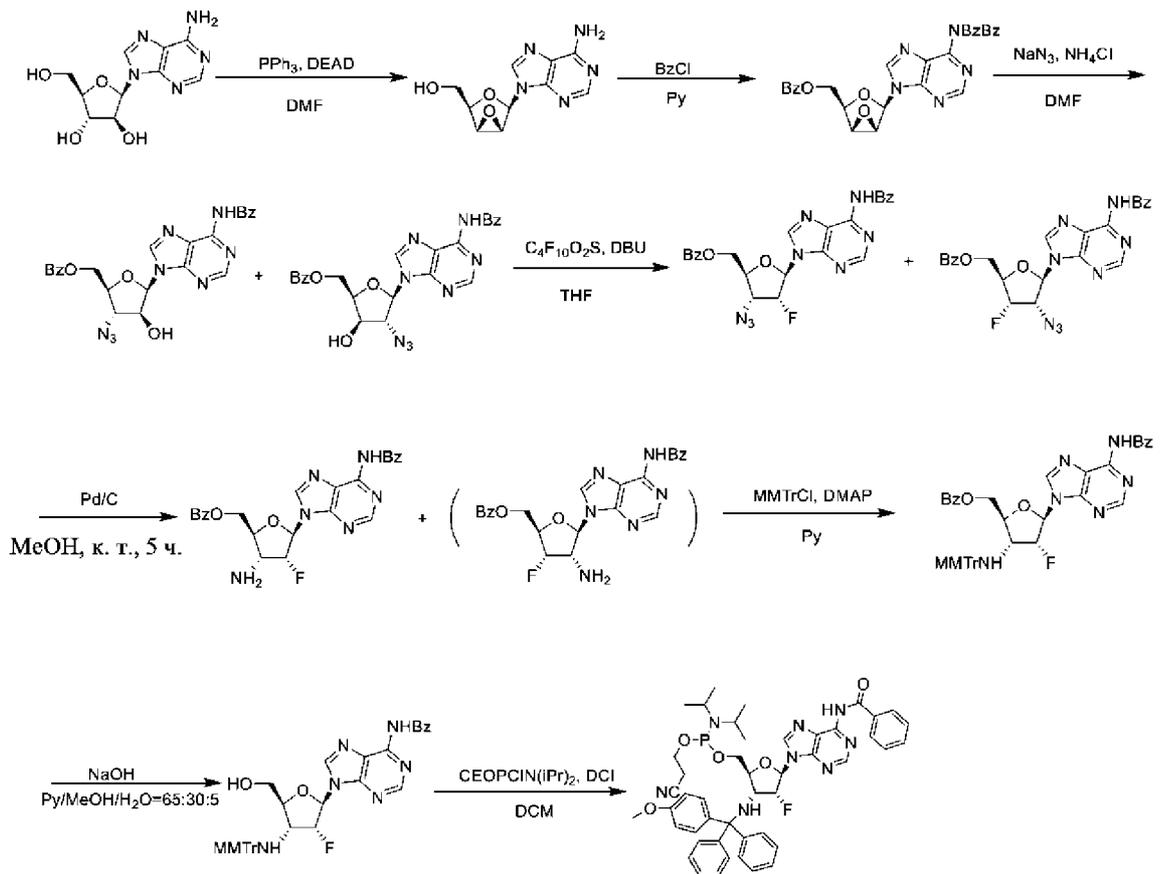


3'-NHMMTr-2'-F A (Bz)

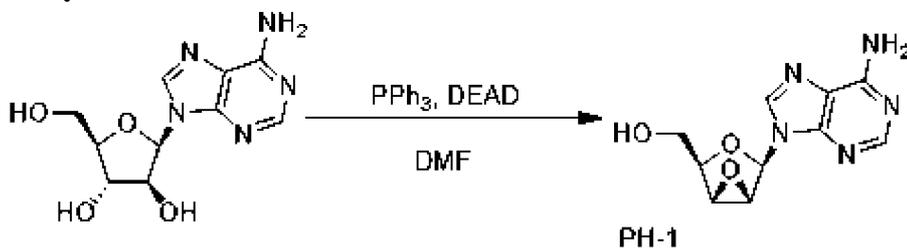


3'-NHMMTr-2'-F G(iBu)

**

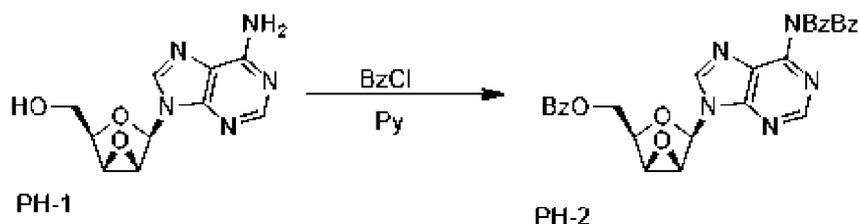


Получение PH-1



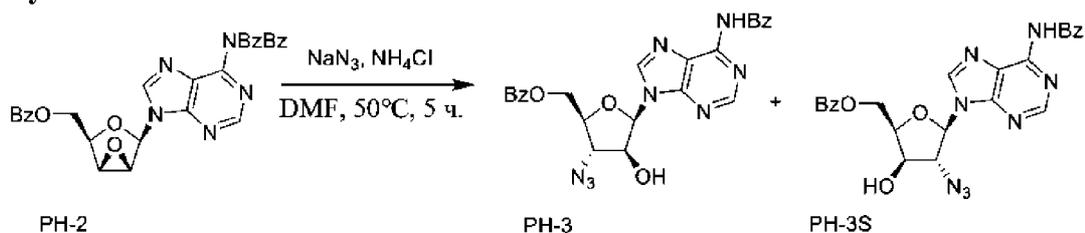
[0231] К раствору (2R,3S,4S,5R)-2-(6-амино-9H-пурин-9-ил)-5-(гидроксиметил)оксолан-3,4-диола (300 г, 1,123 моль, 1,00 экв.) в N, N-диметилформамиде (7500 мл) в инертной атмосфере азота добавляли трифенилфосфин (735 г, 2,802 моль, 2,50 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 15 мин. при 0°C. Затем по каплям добавляли раствор диэтилазодикарбоксилата (449,4 г, 2,581 моль, 2,54 экв.) в N, N-диметилформамиде (7500 мл) при перемешивании при 0°C в течение 60 мин. Полученный раствор перемешивали в течение 2 ч. при 25°C. Полученную смесь концентрировали при пониженном давлении. Продукт осаждали посредством добавления простого эфира. Твердые вещества собирали фильтрацией. Неочищенный продукт очищали путем перекристаллизации из метанола. Твердое вещество высушивали в печи при пониженном давлении. В результате получали 186 г (66%) **PH-1** в виде белого твердого вещества. 1H-ЯМР (DMSO-d₆, 400МГц): 8,34-8,07 (m, 2H), 7,44-7,26 (m, 2H), 6,30-6,21 (m, 1H), 5,07-4,95 (m, 1H), 4,33-4,20 (m, 1H), 4,15-4,03 (m, 2H), 3,71-3,50 (m, 2H).

Получение PH-2



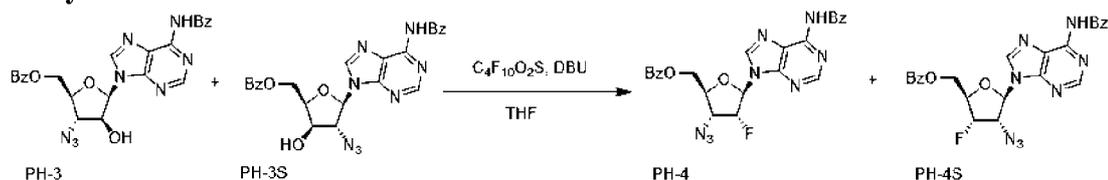
[0232] К раствору **PH-1** (100 г, 401,2 ммоль, 1,00 экв.) в пиридине (1000 мл) в инертной атмосфере азота по каплям добавляли бензоилхлорид (175 г, 1,245 моль, 3,10 экв.) при перемешивании при 0°C в течение 30 мин. Полученный раствор перемешивали в течение 3 ч. при 25°C. Полученный раствор разбавляли с помощью 400 мл этилацетата. Полученную смесь промывали с помощью 3×300 мл воды и 2×300 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия, соответственно. Полученную смесь промывали с помощью 1×300 мл насыщенного раствора хлорида натрия. Смесь высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток наносили на колонку с силикагелем с использованием смеси этилацетата/петролейного эфира (2/1). В результате получали 157 г (70%) **PH-2** в виде белого твердого вещества.

Получение PH-3



[0233] К раствору **PH-2** (30 г, 53,42 ммоль, 1,00 экв.) в N, N-диметилформамиде (300 мл) в инертной атмосфере азота добавляли по порядку хлорид аммония (5,7 г, 106,56 ммоль, 2,00 экв.) и азид натрия (34,8 г, 535,30 ммоль, 10,00 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 5 ч. при 50°C. Полученный раствор разбавляли с помощью 2000 мл дихлорметана. Полученную смесь промывали с помощью 3×2000 мл воды, 1×2000 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия и 1×2000 мл насыщенного раствора хлорида натрия, соответственно. Смесь высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. В результате получали 24 г (90%) **PH-3** и **PH-3S** (5:1) в виде белого твердого вещества.

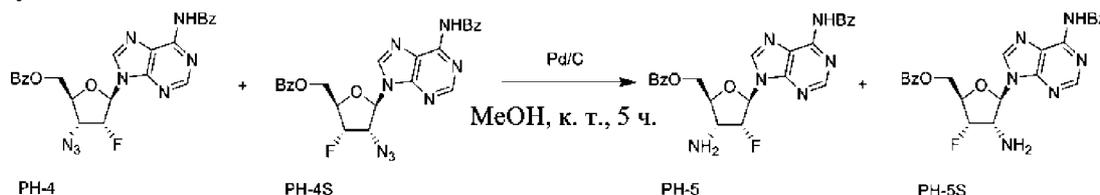
Получение PH-4



[0234] К раствору **PH-3** и **PH-3S** (5:1) (10 г, 19,98 ммоль, 1,00 экв.) в тетрагидрофуране (100 мл) в инертной атмосфере азота добавляли 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен (10,69 г, 70,22 ммоль, 3,50 экв.). Затем по каплям добавляли перфторбутилсульфонилфторид (12,69 г, 2,10 экв.) при перемешивании при 0°C

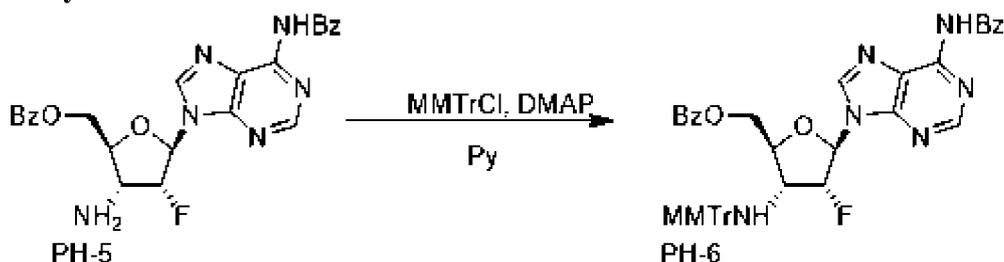
в течение 10 мин. Полученный раствор перемешивали в течение 1,5 ч. при 0°C. Полученный раствор разбавляли с помощью 200 мл дихлорметана. Полученную смесь промывали с помощью 3×200 мл воды, 1×200 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия и 1×200 мл насыщенного раствора хлорида натрия, соответственно. Смесь высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт перекристаллизовывали из смеси этилацетата/петролейного эфира в соотношении 1:1. В результате получали 6 г (60%) **PH-4** и **PH-4S** (5:1) в виде белого твердого вещества. MS масса/заряд [M+H]⁺ (ESI): 503.

Получение PH-5



[0235] К раствору **PH-4** и **PH-4S** (5:1) (10 г, 19,90 ммоль, 1,00 экв.) в тетрагидрофуране (150 мл) добавляли 10% палладий на угле (3,0 г). Из колбы откачивали воздух и ее три раза продували азотом с последующим продуванием водородом. Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч. при комнатной температуре. Твердые вещества отфильтровывали. Полученную смесь концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт (10 г) очищали с помощью Flash-Prep-HPLC при следующих условиях (IntelFlash-1): колонка: C18; подвижная фаза: вода и ацетонитрил (от 30% до 50% ацетонитрила за 30 мин.); детектор: УФ, 254 нм. В результате получали 7 г (74%) **PH-5** в виде белого твердого вещества и 1,0 г **PH-5S** в виде белого твердого вещества. MS масса/заряд [M+H]⁺ (ESI): 477.

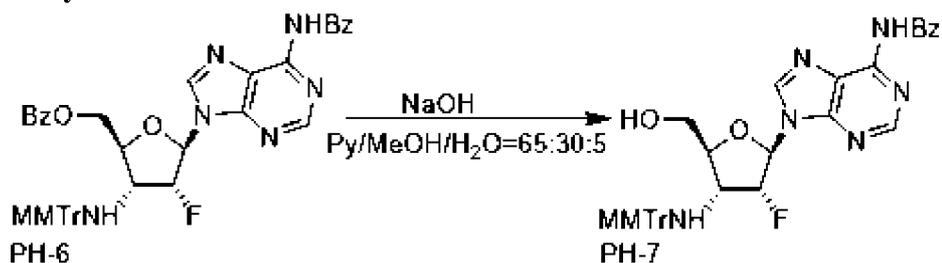
Получение PH-6



[0236] К раствору **PH-5** (4 г, 8,40 ммоль, 1,00 экв.) в пиридине (40 мл) в инертной атмосфере азота добавляли по порядку 4-диметиламинопиридин (1,5 г, 12,28 ммоль, 1,50 экв.) и 4-метокситрифенилметилхлорид (10,3 г, 4,00 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 16 ч. при 25°C. Полученный раствор разбавляли с помощью 300 мл дихлорметана. Полученную смесь промывали с помощью 1×300 мл воды и 3×300 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия. Полученную смесь промывали с помощью 1×300 мл насыщенного раствора хлорида натрия, соответственно. Смесь высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток наносили на колонку с силикагелем с использованием смеси

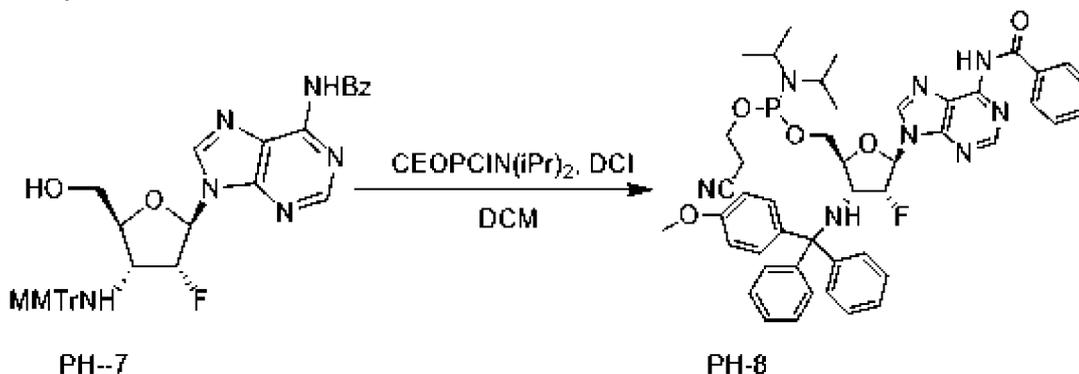
дихлорметана/метанола (100/1). В результате получали 5,7 г (91%) **PH-6** в виде белого твердого вещества.

Получение PH-7



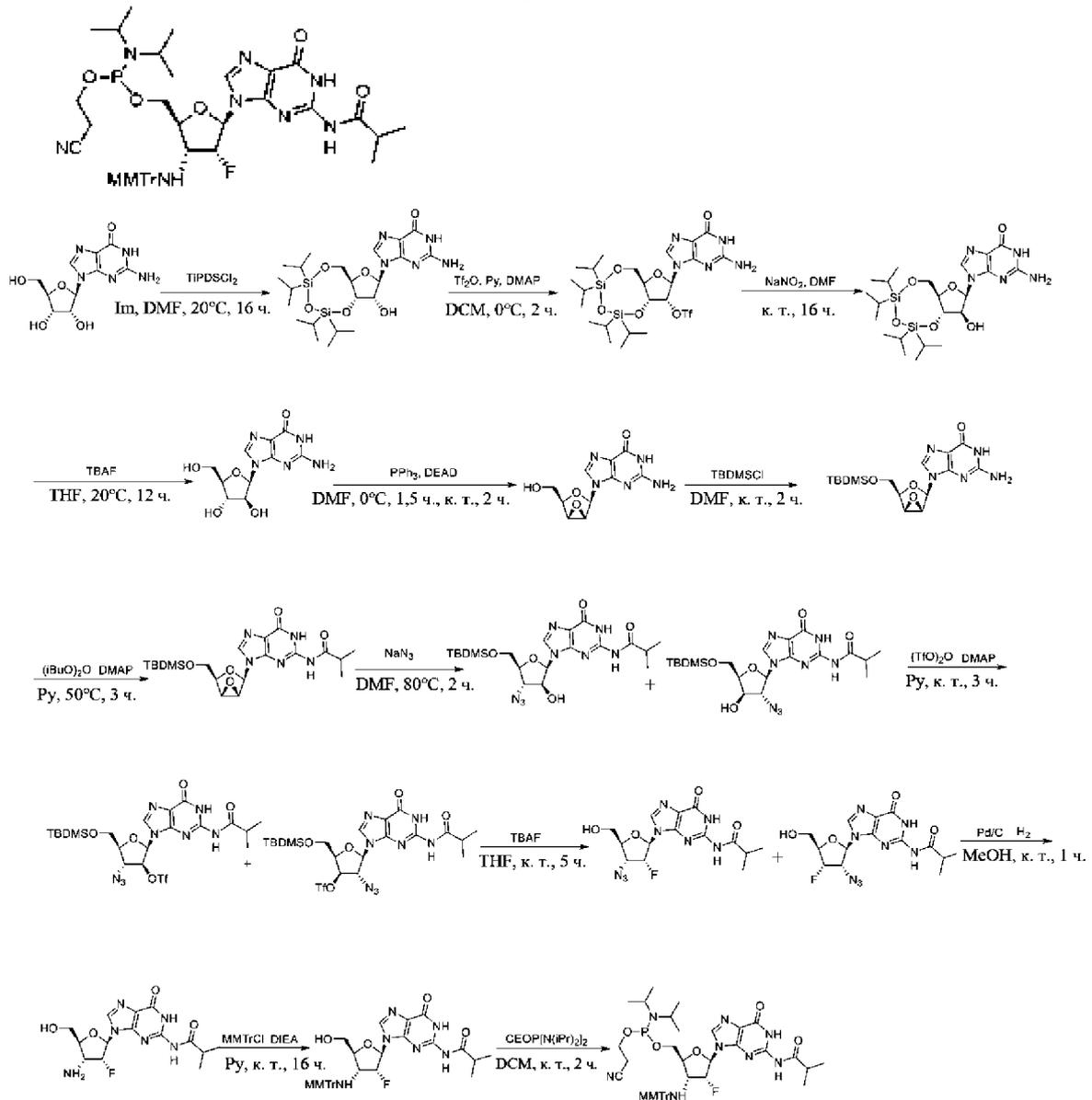
[0237] К раствору **PH-6** (5 г, 6,68 ммоль, 1,00 экв.) в смеси пиридина/метанола/воды (32,2/14,7/2,4 мл) по каплям добавляли гидроксид натрия (2 моль/л) (7,2 мл, 1,10 экв.) при перемешивании при 0°C в течение 5 мин. Полученный раствор перемешивали в течение 20 мин. при 0°C. Затем реакцию гасили путем добавления 200 мл ледяной воды. Полученный раствор экстрагировали с помощью 400 мл дихлорметана и органические слои объединяли. Полученную смесь промывали с помощью 1×300 мл воды и 1×300 мл насыщенного раствора хлорида натрия. Смесь высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток наносили на колонку с силикагелем с использованием смеси метанола/дихлорметана (1:100). В результате получали 4,3 г (100%) **PH-7** в виде белого твердого вещества. MS масса/заряд [M+H]⁺ (ESI): 645.

Получение PH-8

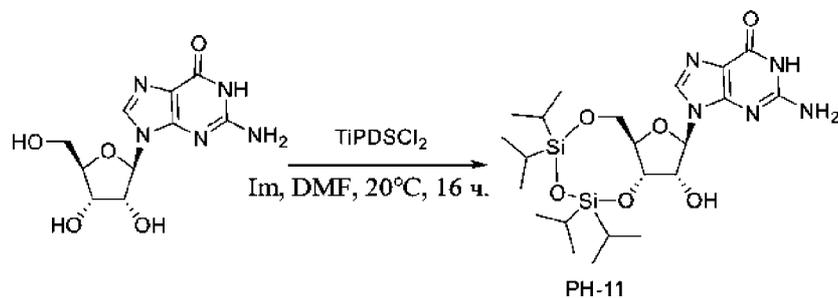


[0238] К раствору **PH-7** (19,4 г, 35,89 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (200 мл) в инертной атмосфере азота добавляли 3-([бис[бис(пропан-2-ил)амино]фосфанил]окси)пропаннитрил (11,79 г, 39,12 ммоль, 1,30 экв.). Затем добавляли 4,5-дицианоимидазол (4,26 г, 1,20 экв.) при 0°C. Полученный раствор перемешивали в течение 30 мин. при комнатной температуре. Полученный раствор разбавляли с помощью 1000 мл дихлорметана. Полученную смесь промывали с помощью 3×800 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия и 1×800 мл раствора хлорида натрия, соответственно. Смесь высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали с помощью Flash-Prep-HPLC при следующих условиях: колонка: C18; подвижная фаза: вода и ацетонитрил (от 40% до 80% ацетонитрила за 6 мин.); детектор: УФ, 254 нм. В результате получали 15,2 г (50%) **PH-8**

виде белого твердого вещества. MS масса/заряд $[M+H]^+$ (ESI): 845.

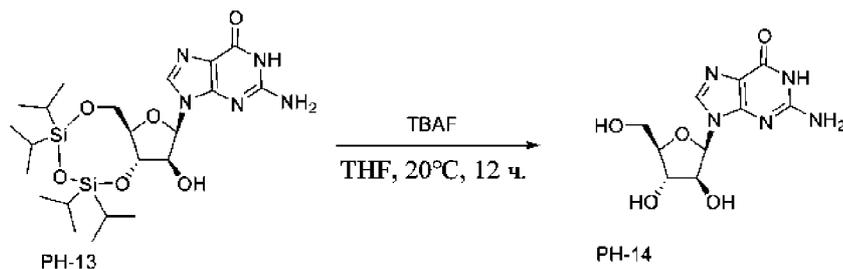


Получение PH-11



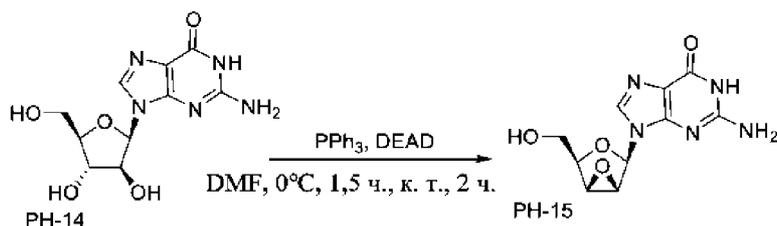
[0239] К раствору 2-амино-9-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)оксолан-2-ил]-6,9-дигидро-1H-пурин-6-она (700 г, 2,47 моль, 1,00 экв.) в N, N-диметилформамиде (7 л) в инертной атмосфере азота добавляли имидазол (504 г, 7,41 моль, 3,00 экв.). Затем по каплям добавляли 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетраизопропилдисилоксан (770 г, 2,44 моль, 1,00 экв.) при перемешивании при 20°C.

Получение PH-14



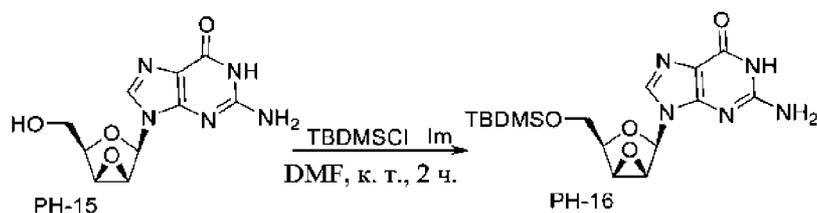
[0242] К раствору **PH-13** (50 г, 95,10 ммоль, 1,00 экв.) в тетрагидрофуране (500 мл) в инертной атмосфере азота добавляли фторид тетрабутиламмония (95 мл, 1,00 экв., 1 н. в тетрагидрофуране). Полученную смесь перемешивали в течение 12 ч. при 20°C. Полученную смесь концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт три раза перекристаллизовывали из смеси метанола/этилацетата в соотношении 1/5 (20 мл/г). Твердые вещества собирали фильтрацией и затем очищали с помощью флэш-хроматографии при следующих условиях: колонка: C18, силикагель; подвижная фаза: вода и ацетонитрил (от 2% до 10% ацетонитрила за 10 мин.); детектор: УФ, 254 нм. В результате получали 16 г (59%) **PH-14** в виде коричневого твердого вещества. ¹H-ЯМР (DMSO-d₆, 400МГц): 10,44(s, 1H), 6,49(s, 2H), 6,02(s, 1H), 5,55-5,65(m, 2H), 5,10(s, 1H), 4,08(m, 2H), 3,76(m, 1H), 3,64(m, 1H).

Получение PH-15



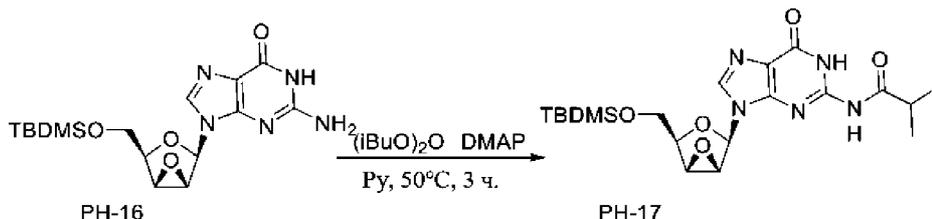
[0243] К раствору **PH-14** (220 г, 776,72 ммоль, 1,00 экв.) в N, N-диметилформамиде (2000 мл) в инертной атмосфере аргона добавляли трифенилфосфин (509 г, 1,94 моль, 2,50 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 1,5 ч. при 0°C. К полученному добавляли по каплям диэтилазодикарбоксилат (338 г, 1,94 моль, 2,50 экв.) при перемешивании при 0°C. Полученный раствор перемешивали в течение 2 ч. при комнатной температуре. Полученную смесь выливали в 20 л холодного этилового эфира. Твердые вещества собирали фильтрацией, затем перекристаллизовывали из смеси метанола/этилацетата в соотношении 1/10 (10 мл/г). В результате получали 100 г (49%) **PH-15** в виде коричневого твердого вещества. MS масса/заряд [M+H]⁺ (ESI): 266.

Получение PH-16



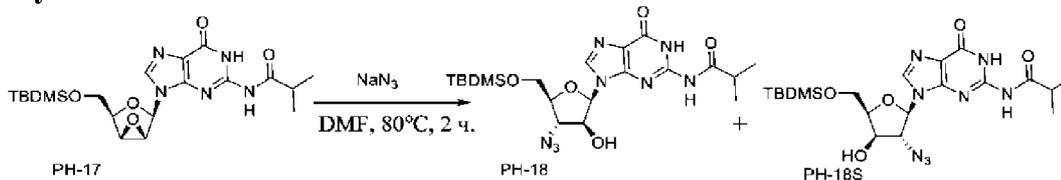
[0244] К раствору **PH-15** (100 г, 377,0 ммоль, 1,00 экв.) в N, N-диметилформамиде (1000 мл) в инертной атмосфере азота добавляли имидазол (77 г, 1,131 моль, 3,00 экв.). Затем по каплям добавляли трет-бутилдиметилсилилхлорид (142 г, 942 ммоль, 1,50 экв.) при перемешивании при 0°C. Полученный раствор перемешивали в течение 2 ч. при комнатной температуре. Реакцию затем гасили путем добавления метанола. Полученную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток наносили на колонку с силикагелем с использованием смеси дихлорметана/метанола (100:1~15:1). В результате получали 80 г (85%) **PH-16** в виде твердого вещества. MS масса/заряд [M+H]⁺ (ESI): 380.

Получение PH-17



[0245] К раствору **PH-16** (73 г, 192,37 ммоль, 1,00 экв.) в пиридине (730 мл) в инертной атмосфере азота добавляли 4-диметиламинопиридин (23,5 г, 192,35 ммоль, 0,50 экв.). Затем по каплям добавляли изомасляный ангидрид (213 г, 1,35 моль, 5,00 экв.) при перемешивании. Полученный раствор перемешивали в течение 3 ч. при 50°C. Реакцию затем гасили путем добавления ледяной воды. Полученный раствор экстрагировали с помощью 3×2000 мл дихлорметана и органические слои объединяли. Полученную смесь промывали с помощью 3×2000 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия, 3×2000 мл воды и 3×2000 мл насыщенного раствора хлорида натрия, соответственно. Органические слои высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток наносили на колонку с силикагелем с использованием смеси дихлорметана/метанола (100:1~20:1). В результате получали 52 г (60%) **PH-17** в виде желтого твердого вещества. MS масса/заряд [M+H]⁺ (ESI): 450.

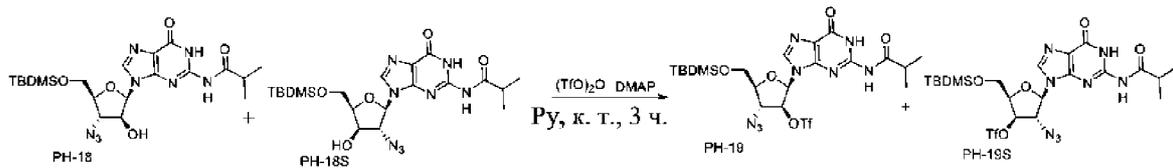
Получение PH-18



[0246] К раствору **PH-17** (20 г, 44,4 ммоль, 1,00 экв.) в N, N-диметилформамиде (100 мл) в инертной атмосфере азота добавляли азид натрия (18 г, 267 ммоль, 6,00 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 2 ч. при 80°C. Полученную смесь разбавляли с помощью 1000 мл дихлорметана. Полученный раствор промывали с помощью 3×1000 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия, 3×1000 мл воды и 3×1000 мл насыщенного раствора хлорида натрия, соответственно. Раствор высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении. Остаток наносили на колонку с силикагелем с использованием смеси дихлорметана/метанола (100/1~40/1). В результате

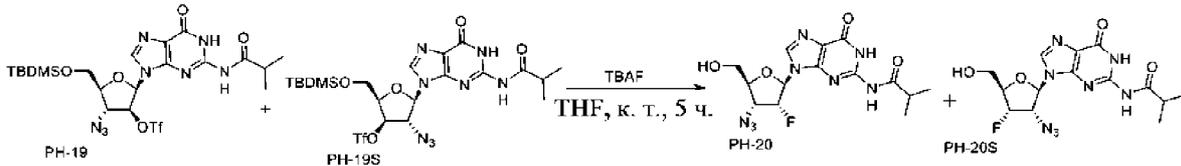
получали 11 г (50%) **PH-18/PH-18S** (5,2:1) в виде желтого твердого вещества. MS масса/заряд $[M+H]^+$ (ESI): 493.

Получение PH-19



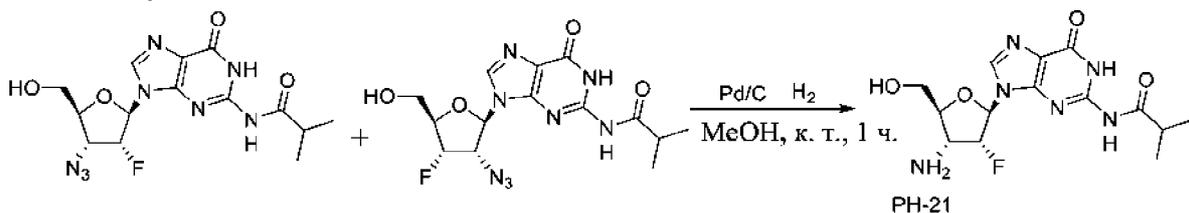
[0247] К раствору **PH-18/PH-18S** (5,2:1) (16 г, 37,87 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (160 мл) добавляли пиридин (23 г, 290,77 ммоль, 9,00 экв.) и диметиламинопиридин (4,35 г, 35,66 ммоль, 1,20 экв.). Затем по каплям добавляли 1,3-бис(трифторметилсульфонил)триоксидан (11,9 г, 37,88 ммоль, 1,20 экв.) при перемешивании при 0°C. Полученный раствор перемешивали в течение 2 ч. при 20°C. Реакцию гасили посредством добавления воды/льда. Полученную смесь экстрагировали с помощью 2×1000 мл дихлорметана и органические слои объединяли. Полученный раствор промывали с помощью 1×1000 мл насыщенного раствора хлорида натрия. Полученный в результате раствор концентрировали при пониженном давлении. В результате получали 16 г (68%) **PH-19/PH-19S** в виде коричневого твердого вещества. Продукт применяли непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки.

Получение PH-20



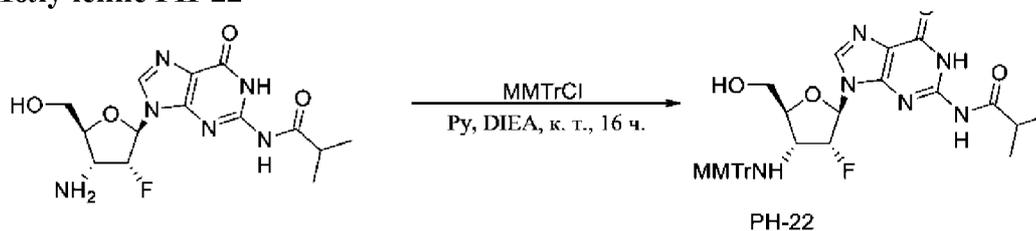
[0248] К раствору **PH-19/PH-19S** (16 г, 25,61 ммоль, 1,00 экв.) в тетрагидрофуране (160 мл) в инертной атмосфере аргона по каплям добавляли фторид тетрабутиламмония (100 мл, 5,00 экв.) при перемешивании при 0°C. Полученный раствор перемешивали в течение 5 ч. при комнатной температуре. Полученный раствор разбавляли с помощью 1000 мл дихлорметана. Полученный раствор промывали с помощью 1×500 мл воды и 1×500 мл насыщенного раствора хлорида натрия, соответственно. Полученный в результате раствор концентрировали при пониженном давлении. Остаток наносили на колонку с силикагелем с использованием смеси дихлорметана/метанола (100/1~20/1). В результате получали 8 г (85%) **PH-20/PH-20S** (7:1) в виде желтого твердого вещества. MS масса/заряд $[M+H]^+$ (ESI): 381.

Получение PH-21



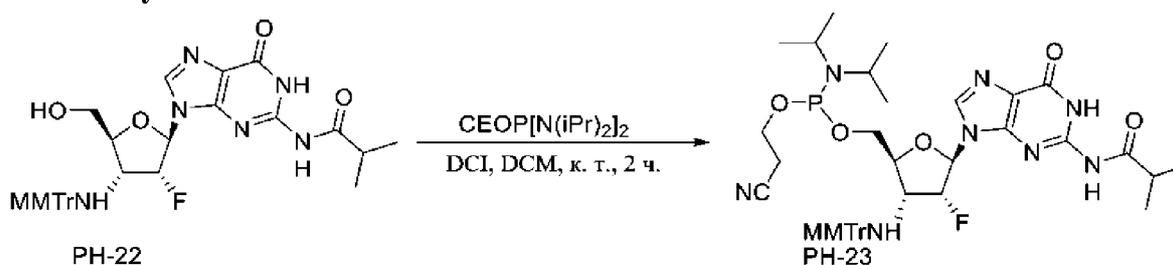
[0249] К раствору **PH-20/PH-20S** (3,4 г, 8,94 ммоль, 1,00 экв.) в метаноле (50 мл) добавляли 10% палладий на угле (1,7 г). Из колбы откачивали воздух и ее три раза продували азотом с последующим продуванием водородом. Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч. при комнатной температуре. Полученный раствор разбавляли с помощью 100 мл метанола. Твердые вещества отфильтровывали. Полученный в результате раствор концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали с помощью Flash-Prep-HPLC при следующих условиях: колонка: C18, силикагель; подвижная фаза: вода и ацетонитрил (от 5% до 50% ацетонитрила за 35 мин.); детектор: УФ, 254 нм. В результате получали 1,7 г (54%) **PH-21** в виде белого твердого вещества. ¹H-ЯМР (DMSO-d₆, 400МГц): 12,13 (s, 1H), 11,91 (s, 1H), 8,91 (s, 2H), 8,23 (s, 2H), 7,25 (m, 1H), 5,78 (m, 1H), 4,62-3,72 (m, 4H), 2,92 (m, 1H), 1,13 (s, 6H).

Получение PH-22



[0250] К раствору **PH-21** (6,0 г, 16,95 ммоль, 1,00 экв.) в смеси пиридина/*N,N*-диизопропилэтиламина (100/20 мл) в инертной атмосфере аргона добавляли 1-(хлордифенилметил)-4-метоксибензол (6,24 г, 20,34 ммоль, 1,20 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 16 ч. при комнатной температуре. Полученный раствор разбавляли с помощью 1000 мл дихлорметана. Полученный раствор промывали с помощью 1×250 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия, 1×250 мл воды и 1×250 мл насыщенного раствора хлорида натрия, соответственно. Остаток наносили на колонку с силикагелем с использованием смеси дихлорметана/метанола (100/1~50/1). В результате получали 13 г (74%) **PH-22** в виде белого твердого вещества. ¹H-ЯМР (DMSO-d₆, 400МГц): 12,15 (s, 1H), 11,70 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,49 (m, 4H), 7,24 (m, 6H), 7,15 (m, 2H), 6,72 (m, 2H), 5,82 (m, 1H), 5,30 (m, 1H), 4,04 (m, 3H), 3,62 (s, 3H), 3,45 (m, 1H), 2,83-2,62 (m, 3H), 1,10 (m, 6H).

Получение PH-23

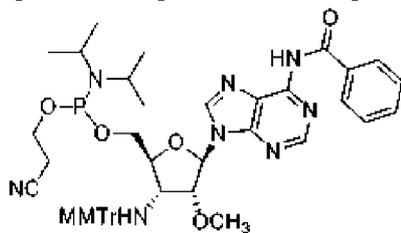


[0251] К раствору **PH-22** (7,8 г, 12,45 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (80 мл) в инертной атмосфере аргона добавляли по порядку 3-(бис[бис(пропан-2-ил)амино]фосфанилокси)пропаннитрил (7,5 г, 24,92 ммоль, 2,00 экв.) и 4,5-

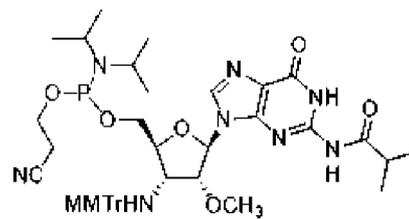
дицианоимдазол (2,2 г, 18,63 ммоль, 1,50 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 2 ч. при комнатной температуре. Полученную смесь разбавляли с помощью 1000 мл дихлорметана. Полученный раствор промывали с помощью 3×250 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия, 3×250 мл воды и 3×250 мл насыщенного раствора хлорида натрия, соответственно. Полученный в результате раствор концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали с помощью Flash-Prep-HPLC при следующих условиях: колонка: C18, силикагель; подвижная фаза: вода и ацетонитрил (от 40% до 95% ацетонитрила за 35 мин.); детектор: УФ, 254 нм. В результате получали 8,06 г (78%) **PH-23** в виде белого твердого вещества. MS масса/заряд [M+H]⁺ (ESI): 827.

Структурные блоки 2'-F-3'-NHTr для синтеза олигомеров

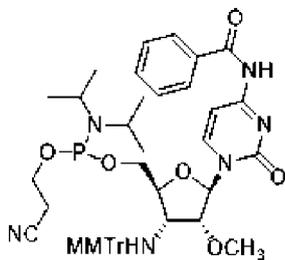
[0252] 2'-O-Me-3'-NH-MMTTr-5'-O-(2-цианозтил-N, N-диизопропил)фосфорамидитные мономеры 6-N-бензоиладенозина (A^{Bz}), 4-N-бензилцитидина (C^{Bz}), 2-N-изобутирилгуанозина (G^{iBu}) и уридина (U), показанные ниже, синтезировали с применением процедуры, описанной в WO 200118015 A1



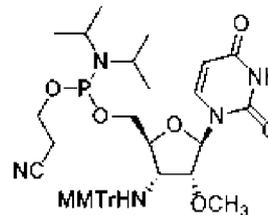
3'-NHMMTr-2'-O-Me A (Bz)



3'-NHMMTr-2'-O-Me-G(iBu)



3'-NHMMTr-2'-O-Me-C(Bz)



3'-NHMMTr-2'-OMe U:

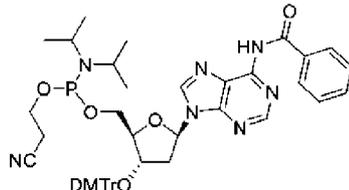
Структурные блоки 2'-O-Me-3'-NHTr для синтеза олигомеров

[0253] Иллюстративные фосфорамидаты включают следующие.

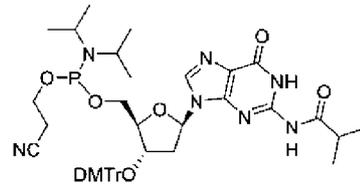
Описание исходных материалов
3'-NHTr-dA(Bz)
3'-NHTr-dC(Bz)
3'-NHTr-dG(iBu)
3'-NHTr-T:
3'-NHMMTr-2'-F-A(NH-Bz)
3'-NHMMTr-2'-F-C(NH-Bz)
3'-NHMMTr-2'-F-G(NH-iBu)

3'-NHMMTr-2'-F-U:
3'-NHMMTr-2'-OMe-A(NH-Bz)
3'-NHMMTr-2'-OMe-C(NH-Bz)
3'-NHMMTr-2'-OMe-G(NH-iBu)
3'-NHMMTr-2'-OMe-U:
3'-NHTr (dA, dC, dG и dT)-CPG 500Å: Загрузка: 64-83 мкмоль/г

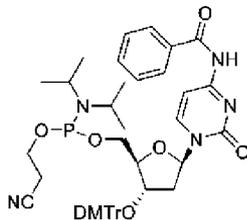
[0254] Фосфорамидит 3'-O-DMT-дезоксиаденозин (NH-Bz), 5'-O-(2-цианоэтил-N, N-диизопропилфосфорамидит, 3'-O-DMT-дезоксигуанозин (NH-iBu), 5'-O-(2-цианоэтил-N, N-диизопропилфосфорамидит, 3'-O-DMT-дезоксцитозин (NH-Bz), 5'-O-(2-цианоэтил-N, N-диизопропилфосфорамидит, 3'-O-DMT-дезокситимидин (NH-Bz), 5'-O-(2-цианоэтил-N, N-диизопропилфосфорамидит для синтеза обратной последовательности и твердые подложки для синтеза обратной последовательности приобретали у коммерчески доступных источников (Chemgenes).



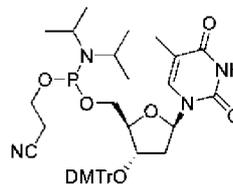
3'-DMTr-dA (Bz)



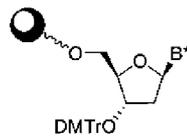
3'-DMTr-dG (iBu)



3'-DMTr-dC (Bz)



3'-DMTr-T:



B* = A, C, G или T

Структурные блоки для синтеза обратной последовательности ДНК, предназначенные для синтеза олигомеров

[0255] Иллюстративные фосфорамидиты для синтеза обратной последовательности, применяемые для настоящего изобретения, включают следующее.

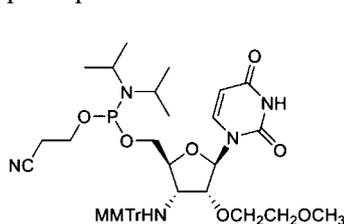
Описание исходных материалов
3'-O-DMTr-2'-OMe-A(NH-Bz)
3'-O-DMTr-2'-OMe-C(NH-Bz)
3'-O-DMTr-2'-OMe-G(NH-iBu)
3'-O-DMTr-2'-OMe-U:

3'-ODMTTr (dA, dC, dG и dT)-CPG 500Å:

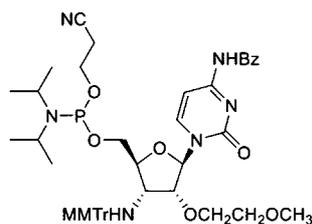
Загрузка: 64-83 мкмоль/г

[0256] Для получения олигомеров со следующими модификациями: 2'-F-NPS-PS-2'-F-NPS, 2'-F-NP-PS-2'-F-NP, 2'-OMe-NP-PS-2'-OMe-NP, 2'-OMe-NPS-DNA-PS-2'-OMe-NPS, синтез проводили в масштабе 1 мкМ в направлении от 5' до 3' с помощью 5'-фосфорамидитных мономеров, разбавленных до концентрации 0,1 М в безводном CH₃CN, в присутствии активатора, представляющего собой 5-(бензилтио)-1Н-тетразол (продолжительность сочетания 2,0-4,0 мин.), со связанным с твердой подложкой олигонуклеотидом с последующими стандартным введением блокирующей группы, окислением и снятием защиты с получением модифицированных олигонуклеотидов. Эффективность поэтапного сочетания для всех модифицированных фосфорамидитов составляла более 98%. Для синтеза олигорибонуклеотидных фосфотиоатов применяли DDTT, (диметиламинометилен)амино)-3Н-1,2,4-дитиазолин-3-тион, как средство для переноса серы. Несущие олигонуклеотид твердые подложки нагревали при комнатной температуре с водным раствором аммиака/метиламина (1:1) в течение 3 ч. в шейкере для отщепления от подложки и удаления защитной группы с неустойчивых к воздействию оснований защитных групп.

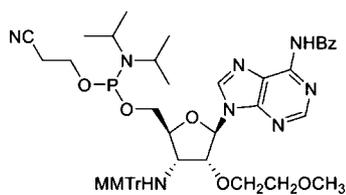
Примеры 1-4



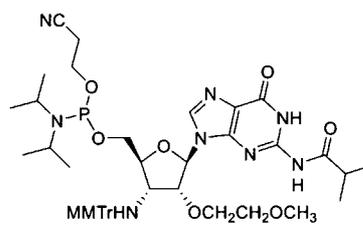
Пример 1



Пример 2



Пример 3



Пример 4

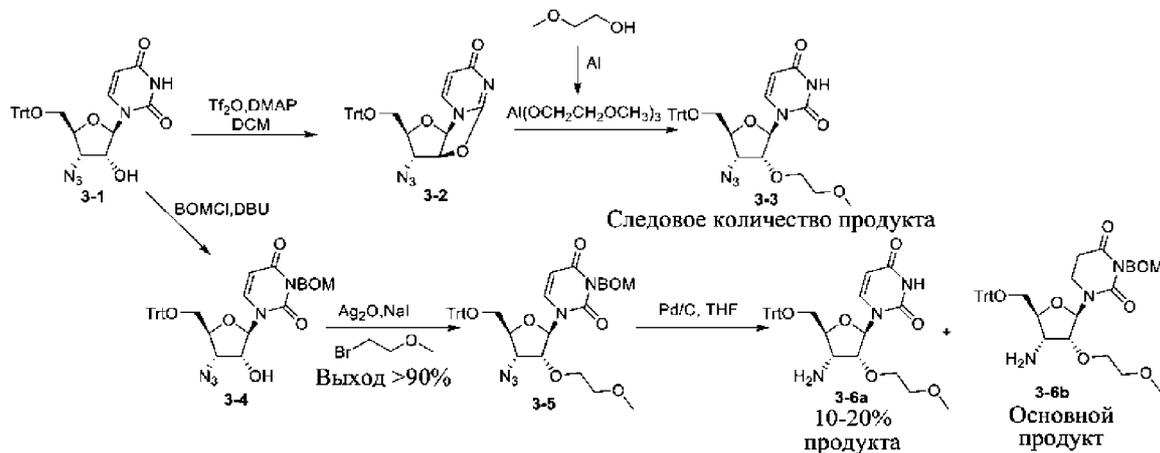
[0257] Соответствующим образом защищенные 2'-О-метоксиэтил-3'-аминонуклеозид-5'-фосфорамидитные структурные блоки (примеры 1-4) получали после химических преобразований, показанных на схемах 1-4.

[0258] Сначала для синтеза 3'-NH-ММТг-2'-О-метоксиэтилфосфорамидитов на основе урацила, пример 5, получали основное промежуточное соединение 3, 3'-азидо-2'-метоксиэтил, с низкими значениями выхода с использованием промежуточного соединения 2, не содержащего воды, как показано на схеме 1.

[0259] Из-за алкилирования с низким выходом 3-1 вводили в реакцию с BOMCl/DBU с получением N-3-защищенного промежуточного соединения 3-4, которое

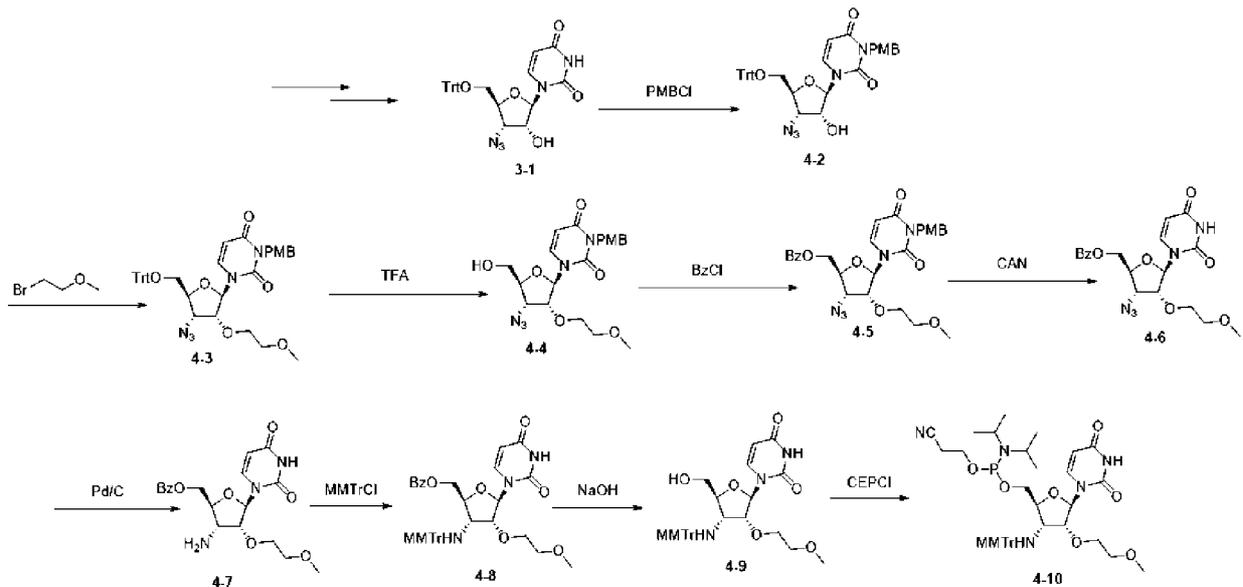
алкилировали с применением 2-бромэтилметилового эфира/Ag₂O/NaI/DMF с получением 2'-О-метоксиэтильного производного 3-5, как показано ниже на схеме 1. В результате снятия защиты с N-3-ВОМ-группы с применением условий гидрогенизации (Pd/C/H₂) получали 10-20% требуемого промежуточного соединения 3-6а, содержащего 3'-аминогруппу, вместе со значительным количеством побочного продукта 3-6б, полученного в результате избыточного восстановления.

Схема 1



[0260] 2'-О-алкилирование с высоким выходом проводили, как показано ниже на схеме 2. Для этого 3-1 обрабатывали с помощью PMBCl/DBU/DMF с получением N-3-защищенного промежуточного соединения 4-2, которое подвергали 2'-О-алкилированию с применением 2-бромэтилметилового эфира/Ag₂O/NaI/DMF с получением 2'-О-метоксиэтильного производного 4-3. Затем путем 5'-детритилирования 4-3 и повторного введения защиты 5'-гидроксильной группы с применением бензоилхлорида получали 4-5.

Схема 2



[0261] Путем снятия защиты в виде PMB-группы с промежуточного соединения 4-5 в мягких условиях получали 4-6. 3'-Азидогруппу промежуточного соединения 4-6 восстанавливали до аминогруппы, при которой непосредственно затем вводили защитную

группу, например посредством реакции с 4-монометокситритилхлоридом, с получением 4-8. Сложный 5'-бензиловый эфир затем отщепляли с применением щелочного раствора с последующим фосфитилированием с применением известных протоколов с получением требуемого 2'-О-метоксиэтоксиуридин-фосфорамидитного мономера 4-10.

[0262] Получение (4-2). К раствору **3-1** (45,30 г, 88,56 ммоль) в DMF (120,00 мл) добавляли PMBCl (20,80 г, 132,84 ммоль) и DBU (44,61 г, 177,12 ммоль), смесь перемешивали при к. т. в течение 2 ч. Добавляли воду, экстрагировали с помощью EA. Органический слой концентрировали и очищали с помощью колонки с получением **4-2** (52,00 г, 82,32 ммоль) в виде белого твердого вещества. ESI-LCMS: масса/заряд 632,3 [M+H]⁺.

[0263] Получение (4-3). К раствору **4-2** (50,00 г, 79,15 ммоль) в DMF (120,00 мл) добавляли 2-бромэтилметиловый эфир (16,50 г, 118,73 ммоль) и Ag₂O (18,34 г, 79,15 ммоль, 2,57 мл), затем добавляли NaI (5,93 г, 39,58 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 12 ч. LC-MS показывала удовлетворительное протекание реакции. Фильтровали и добавляли воду и EA, органический слой концентрировали и очищали с помощью колонки с получением **4-3** (52,00 г, 75,39 ммоль) в виде бесцветного масла. ESI-LCMS: масса/заряд 690,4 [M+H]⁺.

[0264] Получение (4-4). К раствору **4-3** (52,00 г, 75,39 ммоль) в DCM (200,00 мл) добавляли TFA (150,00 мл). Смесь перемешивали при к. т. в течение 1 ч. Реакционную смесь медленно добавляли к холодному NH₄OH, экстрагировали с помощью DCM. Органический слой концентрировали и очищали с получением **4-4** (31,00 г, 69,28 ммоль) в виде бесцветного масла. ESI-LCMS: масса/заряд 448,2 [M+H]⁺. ¹H-ЯМР (DMSO-d₆, 400МГц): δ ppm 8,02 (d, J=8,12Гц, 1H), 7,26-7,23 (m, 2H), 6,87-6,84 (m, 2H), 5,87-5,81 (m, 2H), 5,38 (t, J=5,0Гц, 1H), 4,96-4,85 (m, 2H), 4,36-4,34 (m, 1H), 4,17-4,14 (m, 1H), 4,00-3,97 (m, 1H), 3,83-3,77 (m, 1H), 3,75-3,72 (m, 1H), 3,71 (s, 3H), 3,70-3,68 (m, 1H), 3,61-3,56 (m, 1H), 3,45-3,43 (m, 2H), 3,18 (s, 3H).

[0265] Получение (4-5). К раствору **4-4** (31,00 г, 69,28 ммоль) в пиридине (200,00 мл) добавляли V₂Cl (13,14 г, 93,87 ммоль), реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 15 мин., и концентрировали, и очищали с помощью колонки с получением **4-5** (35,10 г, 63,8 ммоль) в виде белого твердого вещества. ESI-LCMS: масса/заряд 552,2 [M+H]⁺.

[0266] Получение (4-6). К раствору **4-5** (35,10 г, 63,8 ммоль) в ацетонитриле (300,00 мл) и воде (100,00 мл) добавляли церия-аммония нитрат (105 г, 191,40 ммоль), реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 12 ч., и концентрировали, и экстрагировали с помощью EA. Органический слой концентрировали и очищали с помощью колонки с получением **4-6** (27,5 г, 63,75 ммоль) в виде желтого твердого вещества. ESI-LCMS: масса/заряд 432,2 [M+H]⁺.

[0267] Получение (4-7). К раствору **4-6** (27,50 г, 63,75 ммоль) в THF (500,00 мл) добавляли Pd/C (3,00 г), реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 12 ч., и фильтровали, и концентрировали с получением **4-7** (25,00 г, 61,67 ммоль) в виде желтого

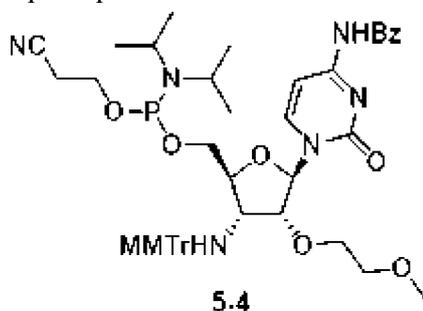
твердого вещества. ESI-LCMS: масса/заряд 406,2 [M+H]⁺.

[0268] Получение (4-8). К раствору **4-7** (25,00 г, 61,67 ммоль) в DCM (300,00 мл) добавляли MMTriCl (28,49 г, 92,51 ммоль) и коллидин (14,95 г, 123,34 ммоль), затем добавляли AgNO₃ (15,7 г, 92,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 1 ч., и фильтровали, и органический слой промывали водой, высушивали над Na₂SO₄ и очищали с помощью колонки с силикагелем с получением **4-8** (33,00 г, 48,69 ммоль) в виде желтого твердого вещества.

[0269] Получение (4-9). К раствору **4-8** (14,50 г, 21,39 ммоль) добавляли 1 н. NaOH в метаноле (200 мл) в воде (20 мл), реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 1 ч., и концентрировали, и экстрагировали с помощью DCM, органический слой концентрировали и очищали с помощью колонки с силикагелем с получением **4-9** (11,50 г, 20,05 ммоль) в виде белого твердого вещества. ¹H-ЯМР (DMSO-d₆, 400МГц): δ ppm 11,26 (s, 1H), 7,95 (d, J=8,4Гц, 1H), 7,47-7,44 (m, 4H), 7,34-7,17 (m, 8H), 6,82 (d, J=8,8Гц, 2H), 5,50-5,48 (m, 2H), 5,13 (t, J=3,6Гц, 1H), 4,05-3,98 (m, 3H), 3,78 (s, 3H), 3,52-3,49 (m, 1H), 3,34-3,32 (m, 2H), 3,14 (s, 3H), 3,08-3,04 (m, 1H), 2,89-2,86 (m, 1H), 2,70 (d, J=10,0 Гц, 1H), 1,51 (d, J=4,4Гц, 1H).

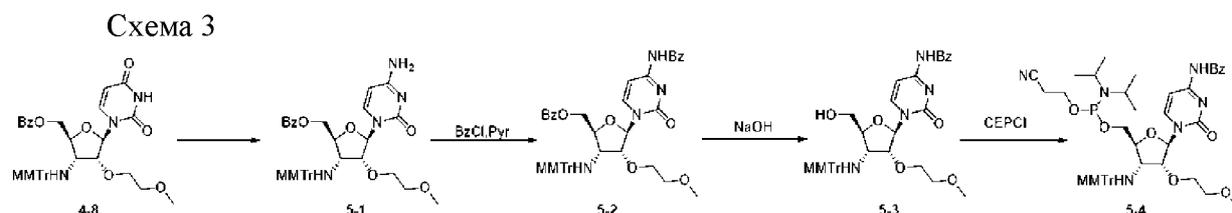
[0270] Получение (4-10). К раствору **4-9** (11,50 г, 20,05 ммоль) в DCM (100,00 мл) добавляли DMAP (489,85 мг, 4,01 ммоль) и DIPEA (10,36 г, 80,19 ммоль, 14,01 мл). Затем к раствору добавляли CEPCL (5,70 г, 24,06 ммоль). Смесь перемешивали при к. т. в течение 30 мин. Реакцию гасили насыщенным раствором NaHCO₃. Органический слой промывали солевым раствором, высушивали над Na₂SO₄, концентрировали с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали с помощью Flash-Prep-HPLC. Продукт растворяли в безводном толуоле и три раза концентрировали. Затем продукт растворяли в безводном ацетонитриле и три раза концентрировали. В результате получали 13 г **4-10** в виде белого твердого вещества. MS масса/заряд [M-H]⁻ (ESI): 772,3; ¹H-ЯМР (CDCl₃, 400МГц): 9,01(s, 1H), 8,07-7,61(m, 1H), 7,53-7,41(m, 6H), 7,29-7,15 (m, 5H), 6,79-6,76 (m, 2H), 5,63-5,57 (m, 2H), 4,27-4,15 (m, 2H), 4,06-3,95 (m, 1H), 3,85-3,77(m, 1H), 3,75(s, 3H), 3,69-3,35(m, 7H), 3,23(d, J=4Гц, 1H), 2,26-2,91(m, 3H), 2,59(t, J=6,4Гц, 1H), 1,75-1,39(m, 1H), 1,21-1,11(m, 12H). ³¹PЯМР (162 МГц, CDCl₃): 149,10, 148,26.

Пример 5



[0271] 2'-О-Метоксиэтокси-NH-бензоил-цитозин-фосфорамидитное соединение **5-4** получали путем превращения уридинового промежуточного соединения 4-8 в аналог 3'-аминоцитидина 5-1 с последующим фосфитированием с применением известных

протоколов с получением требуемого 2'-О-метоксиэтокси-цитидин-фосфорамидитного мономера **5-4**, как показано ниже на схеме 3.



[0272] Получение (5-1). К раствору **4-8** (18,50 г, 27,30 ммоль) в ацетонитриле (250,00 мл) добавляли TPSCl (16,49 г, 54,60 ммоль) и DMAP (6,67 г, 54,60 ммоль), затем к раствору добавляли TEA (5,52 г, 54,60 ммоль, 7,56 мл). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 5 ч. в атмосфере N₂. К реакционной смеси добавляли NH₄OH (50,00 мл). Смесь перемешивали при к. т. в течение 12 ч. Раствор концентрировали и экстрагировали с помощью EA. Органический слой промывали солевым раствором и высушивали над Na₂SO₄. Органический слой концентрировали и очищали с помощью колонки с силикагелем с получением **5-1** (16,00 г, 23,64 ммоль) в виде желтого твердого вещества.

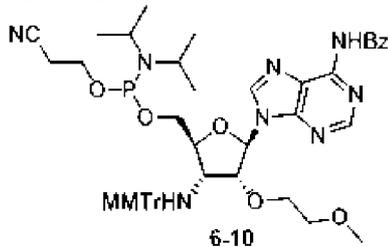
[0273] Получение (5-2). К раствору **5-1** (16,00 г, 23,64 ммоль) в пиридине (100,00 мл) добавляли BzCl (4,96 г, 35,46 ммоль) при 0°C. Смесь перемешивали при к. т. в течение 1 ч. Раствор концентрировали и очищали с помощью колонки с силикагелем с получением **5-2** (17,40 г, 22,28 ммоль) в виде белого твердого вещества.

[0274] Получение (5-3). Соединение **5-2** (17,40 г, 22,28 ммоль) добавляли к 180 мл 1 н. раствора NaOH в смеси пиридина/MeOH/H₂O (65/30/5) при 0°C. Суспензию перемешивали при 0°C в течение 15 мин. Реакционную смесь гасили добавлением насыщ. раствора NH₄Cl. Раствор экстрагировали с помощью EA и объединенные органические слои промывали с помощью насыщ. раствора NaHCO₃, солевого раствора, высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью колонки с получением **5-3** (12,50 г, 18,47 ммоль) в виде белого твердого вещества. 1H-ЯМР (DMSO-d₆, 400МГц): δ ppm 12,25 (s, 1H), 8,53 (d, J=7,6Гц, 1H), 8,01 (d, J=5,2Гц, 2H), 7,64-7,60 (m, 1H), 7,52-7,42 (m, 6H), 7,31 (d, J=8,8Гц, 2H), 7,26-7,14 (m, 7H), 6,79 (d, J=8,8Гц, 2H), 5,55 (s, 1H), 5,23 (t, J=3,6Гц, 1H), 4,09-3,97 (m, 3H), 3,73 (s, 3H), 3,70-3,66 (m, 1H), 3,38-3,34 (m, 2H), 3,17 (s, 3H), 3,11-3,05 (m, 1H), 2,96-2,91 (m, 1H), 2,68 (d, J=10,8Гц, 1H), 1,49 (d, J=4Гц, 1H).

[0275] Получение (5-4). К раствору **5-3** (12,50 г, 18,47 ммоль) в DCM (100,00 мл) добавляли DMAP (451,30 мг, 3,69 ммоль) и DIPEA (9,55 г, 73,88 ммоль, 12,90 мл), затем добавляли CEPCI (5,25 г, 22,16 ммоль). Смесь перемешивали при к. т. в течение 30 мин. Реакцию гасили насыщенным раствором NaHCO₃. Органический слой промывали солевым раствором, высушивали над Na₂SO₄, концентрировали с получением неочищенного продукта. Неочищенное вещество подвергали Flash-Prep-HPLC. Продукт растворяли в безводном толуоле и три раза концентрировали. Затем продукт растворяли в безводном ацетонитриле и три раза концентрировали. В результате получали 13 г **5-4** в

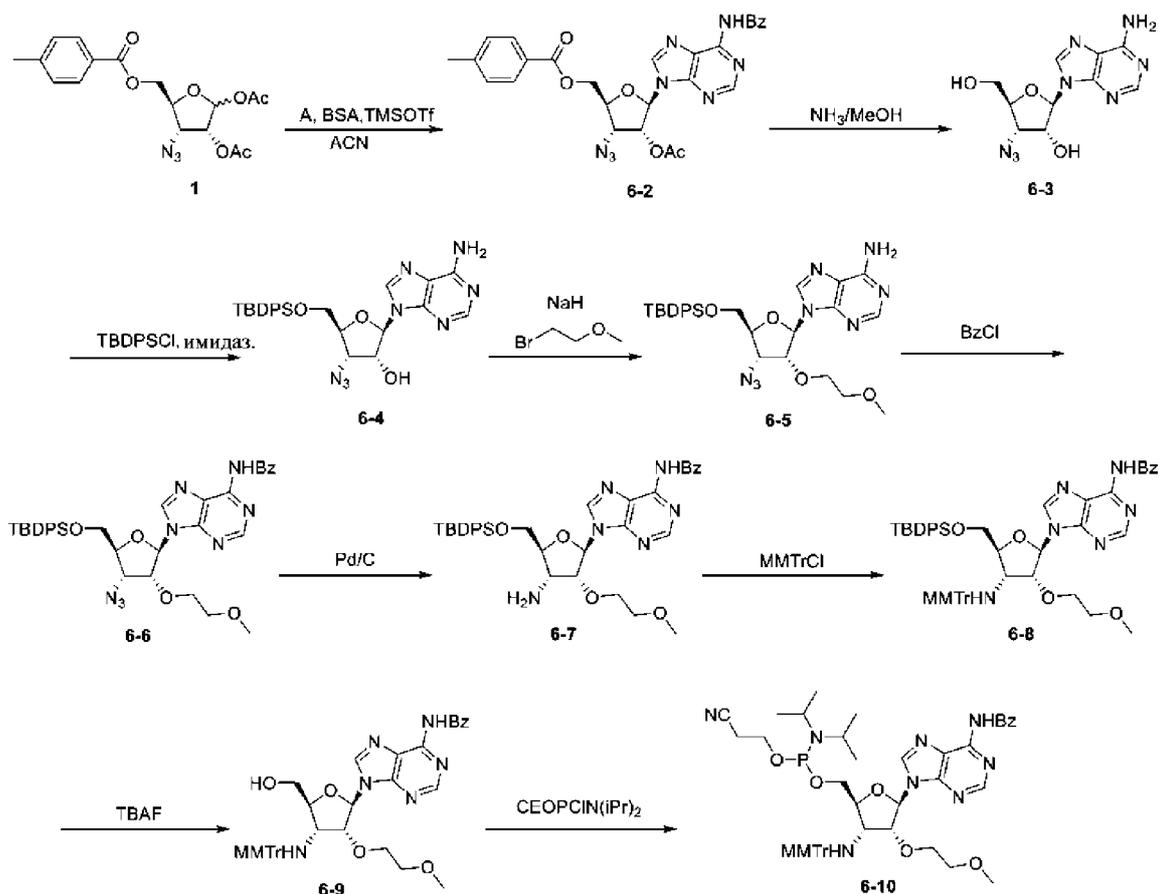
виде белого твердого вещества. MS масса/заряд $[M-H]^-$ (ESI): 875,4. 1H -ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ ppm 8,64-8,20 (m, 2H), 7,90-7,88 (m, 2H), 7,62-7,58 (m, 1H), 7,53-7,39 (m, 8H), 7,25-7,15 (m, 6H), 6,78-6,74 (m, 2H), 5,69 (d, $J=1,72$ Гц, 1H), 4,37-4,21 (m, 2H), 4,10-4,03 (m, 1H), 3,90-3,79 (m, 2H), 3,75 (d, $J=1,64$ Гц, 3H), 3,68-3,52 (m, 3H), 3,46-3,42 (m, 2H), 3,26 (d, $J=1,2$ Гц, 3H), 3,17-2,97 (m, 2H), 2,94-2,87 (m, 1H), 2,67-2,48 (m, 2H), 1,79-1,51 (m, 1H), 1,26-1,18 (m, 12H). ^{31}P ЯМР (162 МГц, $CDCl_3$): 148,93, 148,03

Пример 6



[0276] Синтез аналога 2'-О-метоксиэтиладенозина **6-10** осуществляли, как показано ниже на схеме 6. Из промежуточного соединения 6-2 в основных условиях ($NH_3/MeOH$) получали в результате диол 6-3, из которого затем посредством введения защитной группы для 5'-гидроксигруппы с применением TBDPSCl получали 6-4, промежуточное соединение 6-4. Затем посредством 2'-О-алкилирования 6-4 с применением 2-бромэтилметилового эфира/ NaN/DMF получали 2'-О-метоксиэтильное производное 6-5 без защиты С-6-экзоциклического амина 6-4. В соответствии с настоящим изобретением осуществляли селективное алкилирование 2'-ОН-группы промежуточного соединения 6-4.

Схема 4



[0277] 3'-Азидогруппу промежуточного соединения 6-5 восстанавливали до аминогруппы 6-7, при которой затем непосредственно вводили защитную группу, например посредством реакции с 4-монометокситритилхлоридом, с получением предшественника 6-8 после снятия защиты в виде 5'-OTBDPS-группы с применением TBAF/THF. Проводили фосфитилирование 6-9 с применением известных протоколов с получением требуемого 2'-О-метоксиэтоксиаденин-НН-бензоилфосфорамидитного мономера 6-10.

[0278] Получение (6-2). К раствору соединения **1** (79,50 г, 210,68 ммоль) в сухом ACN (1,20 л) добавляли N-(5Н-пурин-6-ил)бензамид (100,80 г, 421,36 ммоль) и BSA (180,07 г, 884,86 ммоль). Полученную суспензию перемешивали при 50°C, пока она не стала прозрачной. Затем смесь охлаждали при -20°C и с помощью шприца добавляли TMSOTf (93,54 г, 421,36 ммоль). Затем смесь перемешивали при 70°C в течение 72 ч. в атмосфере N₂, и гасили с помощью насыщ. раствора NaHCO₃, и экстрагировали с помощью DCM. Органический слой высушивали над Na₂SO₄, затем выпаривали растворитель и остаток очищали на силикагеле с получением соединения **6-2** (107,50 г, 192,26 ммоль, выход 91,26%) в виде желтого твердого вещества. ¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO): δ=11,28 (s, 1H), 8,64 (d, J=6,4 Гц, 2H), 8,05 (d, J=8,0 Гц, 2H), 7,84 (d, J=8,0 Гц, 2H), 7,66 (t, J=7,6 Гц, 1H), 7,56 (t, J=8,0 Гц, 2H), 7,33 (d, J=8,0 Гц, 2H), 6,37 (d, J=3,6 Гц, 1H), 6,17 (dd, J=6,0 Гц, 1H), 5,09 (t, J=6,8 Гц, 1H), 4,69-4,56 (m, 2H), 4,40-4,38 (m, 1H), 2,39 (s, 3H), 2,17 (s, 3H). ESI-LCMS: масса/заряд 557,2 [M+H]⁺.

[0279] Получение (6-3). Раствор соединения **6-2** (107,50 г, 192,26 ммоль)

растворяли в 33 вес. % метиламина в этаноле (600,00 мл), затем смесь перемешивали при 20°C в течение 16 ч., затем растворитель выпаривали, промывали с помощью 50% EtOAc в петролейном эфире (1,5 л), фильтровали с получением соединения **6-3** (52,50 г, 179,64 ммоль, выход 93,44%) в виде светло-желтого твердого вещества. ESI-LCMS: масса/заряд 293,1 [M+H]⁺.

[0280] Получение (6-4). Раствор соединения **6-3** (52,50 г, 179,64 ммоль), имидазола (18,32 г, 269,46 ммоль) и TBDPS-Cl (54,34 г, 197,60 ммоль) в пиридине (500,00 мл) перемешивали при 20°C в течение 2 ч.; LC-MS показывала израсходование **6-3**. Затем гасили с помощью MeOH (30 мл), концентрировали с получением неочищенного продукта, который очищали на силикагеле с получением соединения **6-4** (72,60 г, 136,81 ммоль, выход 76,16%) в виде белого твердого вещества. ¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO): δ=8,29 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,63-7,59 (m, 4H), 7,48-7,33 (m, 8H), 6,36 (d, J=5,6 Гц, 1H), 5,97 (d, J=4,4 Гц, 1H), 5,10-5,06 (m, 1H), 4,47 (t, J=5,6 Гц, 1H), 4,14-4,11 (m, 1H), 3,94 (dd, J=11,2 Гц, 1H), 3,83 (dd, J=11,6 Гц, 1H), 0,99 (s, 9H). ESI-LCMS: масса/заряд 531,3 [M+H]⁺.

[0281] Получение (6-5). К раствору **6-4** (35,00 г, 65,96 ммоль) и 1-бром-2-метоксиэтана (18,33 г, 131,91 ммоль) в сухом DMF (400,00 мл) добавляли NaI (19,77 г, 131,91 ммоль) и Ag₂O (15,29 г, 65,96 ммоль), смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч. Затем реакционную смесь выливали в ледяную воду, экстрагировали с помощью EA, промывали солевым раствором и высушивали над безводным Na₂SO₄. Растворитель выпаривали и остаток очищали на силикагеле с получением **6-5** (23,70 г, 40,26 ммоль, выход 61,04%) в виде белого твердого вещества и в виде побочного продукта с потерей TBDPS (5,20 г, 9,81 ммоль, выход 14,87%) в виде белого твердого вещества. ¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO): δ=8,31 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 7,63-7,60 (m, 4H), 7,47-7,44 (m, 2H), 7,40-7,36 (m, 6H), 6,10 (d, J=4,4 Гц, 1H), 5,02 (t, J=4,8 Гц, 1H), 4,69 (t, J=5,6 Гц, 1H), 4,18-4,14 (m, 1H), 3,95 (dd, J=11,6 Гц, 1H), 3,84 (dd, J=11,6 Гц, 1H), 3,78-3,75 (m, 2H), 3,45 (t, J=4,8 Гц, 1H), 3,16 (s, 3H), 0,99 (s, 9H). ESI-LCMS: масса/заряд 589,5 [M+H]⁺.

[0282] Получение (6-6). К раствору **6-5** (31,23 г, 53,04 ммоль) в пиридине (300,00 мл) при 0°C по каплям добавляли VzCl (11,22 г, 79,56 ммоль). Смесь перемешивали при к. т. в течение 2 ч. Затем раствор охлаждали до 0°C, и добавляли гидроксид аммония (20 мл, 30%), и обеспечивали нагревание смеси до к. т., затем выпаривали растворитель, добавляли 300 мл H₂O и 600 мл EA в отдельный раствор, водную фазу экстрагировали с помощью EA, объединяли органическую фазу и промывали солевым раствором, высушивали над безводным Na₂SO₄, удаляли растворитель и остаток очищали на силикагеле с получением **6-6** (28,70 г, 41,42 ммоль, выход 78,09%) в виде белого твердого вещества. ESI-LCMS: масса/заряд 693,4 [M+H]⁺.

[0283] Получение (6-7). К раствору **6-6** (28,70 г, 41,42 ммоль) в EA (150,00 мл) добавляли Pd/C (3,00 г) и MeOH (150,00 мл) в атмосфере H₂. Смесь перемешивали при к. т. в течение 5 ч. Затем реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали с

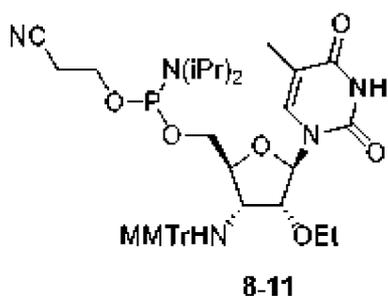
получением **6-7** (25,49 г, 38,22 ммоль, выход 92,27%) в виде серого твердого вещества. ESI-LCMS: масса/заряд 667,3 [M+H]⁺.

[0284] Получение (6-8). К раствору **6-7** (25,49 г, 38,22 ммоль) и AgNO₃ (12,98 г, 76,44 ммоль) в DCM (300,00 мл) добавляли коллидин (13,89 г, 114,66 ммоль) и MMTrCl (19,43 г, 57,33 ммоль), смесь перемешивали при к. т. в течение 2 ч. Затем реакцию смесь выливали в ледяную воду, органический слой экстрагировали с помощью DCM, промывали солевым раствором и высушивали над безводным Na₂SO₄, растворитель удаляли и остаток очищали на силикагеле с получением **6-8** (32,79 г, 34,92 ммоль, выход 91,36%) в виде серого твердого вещества.

[0285] Получение (6-9). К раствору **6-8** (32,79 г, 34,92 ммоль) в THF (300,00 мл) добавляли TBAF (1 M, 35,00 мл), смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 ч. Затем удаляли растворитель и остаток очищали на силикагеле с помощью EA с получением **6-9** (22,22 г, 31,71 ммоль, выход 90,82%) в виде белого твердого вещества. ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ=8,68 (s, 1H), 8,32 (s, 1H), 8,04 (d, J=7,2 Гц, 2H), 7,61-7,57 (m, 1H), 7,53-7,48 (m, 6H), 7,40 (d, J=8,8 Гц, 2H), 7,21-7,12 (m, 6H), 6,73 (d, J=8,8 Гц, 2H), 6,09 (d, J=2,4 Гц, 2H), 4,08-4,02 (m, 2H), 3,93-3,87 (m, 1H), 3,72 (s, 3H), 3,58-3,53 (m, 1H), 3,43-3,39 (m, 3H), 3,24-3,19 (m, 4H), 2,19 (br, 1H).

[0286] Получение (6-10). К раствору **6-9** (14,00 г, 19,98 ммоль), DMAP (488,19 мг, 4,00 ммоль) и DIPEA (6,46 г, 49,95 ммоль, 8,73 мл) в сухом DCM (100,00 мл) по каплям добавляли CEPCL (5,68 г, 23,98 ммоль) в атмосфере Ar. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем реакцию смесь промывали с помощью 10% NaHCO₃ (водн.) и солевого раствора, высушивали над Na₂SO₄, растворитель удаляли и остаток очищали посредством кол. хром. с помощью смеси PE/EA, затем концентрировали с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт (10 г, растворенный в 10 мл ACN) очищали с помощью Flash-Prep-HPLC с получением **6-10** (12,60 г, 13,98 ммоль, выход 69,99%) в виде белого твердого вещества. Затем продукт растворяли в сухом толуоле (15 мл) и три раза концентрировали, и при этом три раза с помощью сухого ACN. ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ=9,12 (d, J=46,8 Гц, 1H), δ=8,71 (d, J=11,6 Гц, 1H), 8,50 (s, 0,6H), 8,22 (s, 0,4H), 8,04 (t, J=7,2 Гц, 2H), 7,63-7,59 (m, 1H), 7,55-7,46 (m, 6H), 7,40-7,37 (m, 2H), 7,19-7,06 (m, 6H), 6,69 (dd, J=8,8 Гц, 2H), 6,03 (d, J=3,2 Гц, 1H), 4,36-4,24 (m, 2H), 3,92-3,78 (m, 2H), 3,71 (d, J=11,6 Гц, 3H), 3,67-3,33 (m, 7H), 3,29 (d, J=11,2 Гц, 3H), 3,17-3,10 (m, 1H), 2,88 (dd, J=27,2 Гц, 1H), 2,65-2,50 (m, 2H), 2,38 (d, J=4,4 Гц, 0,4H), 1,80 (d, J=4,0 Гц, 0,6H), 1,23-1,15 (m, 12H). ³¹PЯМР (400 МГц, CDCl₃): 148,86, 148,22. ESI-LCMS: масса/заряд 901,3 [M+H]⁺.

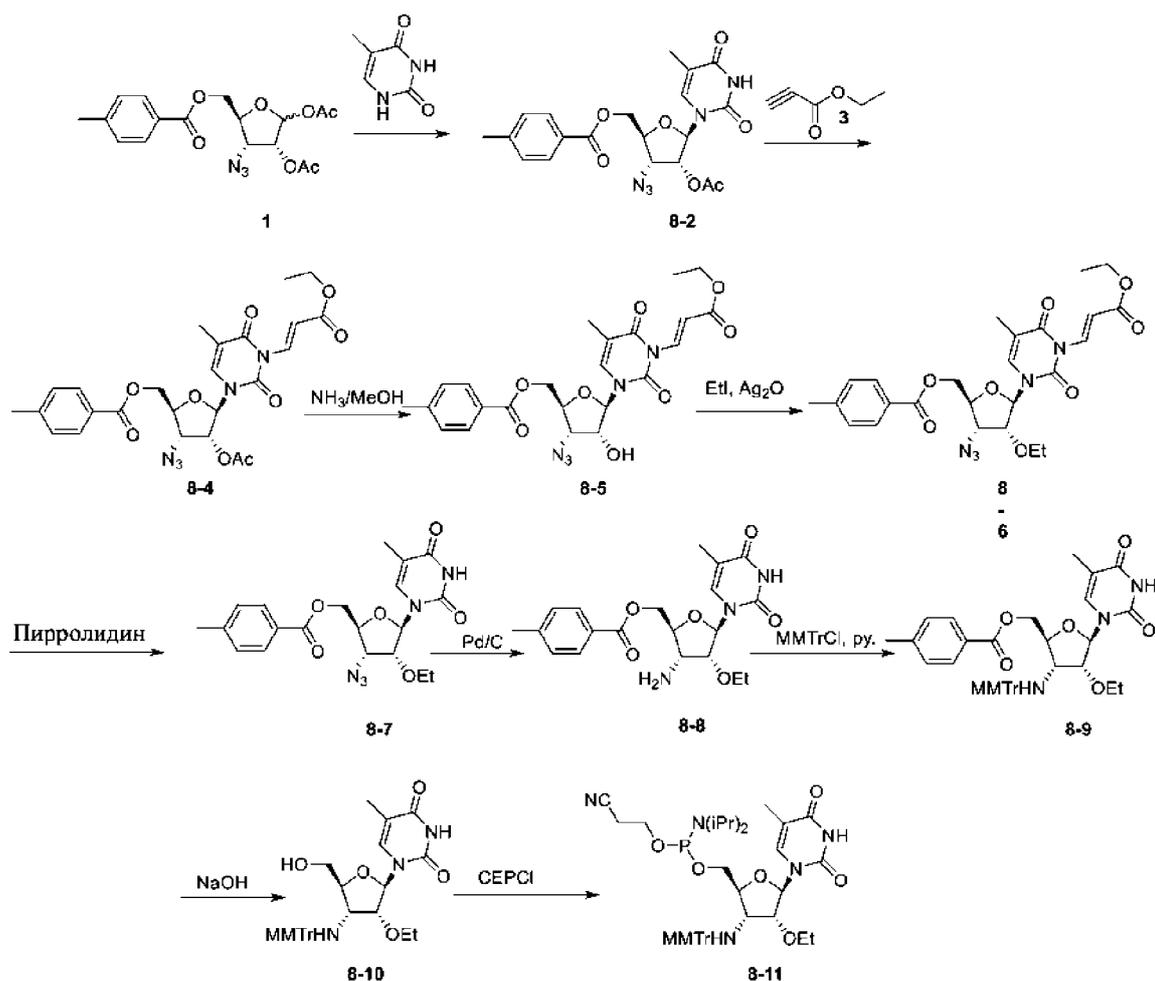
Пример 7



[0287] После химических преобразований, показанных на схеме 5, получали соответствующим образом защищенный 2'-О-этил-3'-амино-5'-фосфорамидит (пример 9, 10, 11, 12).

[0288] Сперва для синтеза 3'-NH-ММтр-2'-О-этилфосфорамидитов на основе тимина, примера 9, в промежуточное соединение 2 вводили защитную группу, например этилпропионат, в присутствии диметиламинопиридина (схема 8) с получением основного N-3-защищенного промежуточного соединения **8-4** для способствования 2'-О-алкилированию с более высоким выходом. Посредством дополнительного деацетилирования **8-4** получали промежуточное соединение **8-5** с С-2'-гидроксигруппой.

Схема 5



[0289] Посредством дополнительного алкилирования с применением йодэтана получали 2'-О-этилнуклеозид **8-6**. Промежуточное соединение **8-6** преобразовывали в 2'-

О-этил-3'-амино-5'-фосфорамидит **8-11** на основе тимина, следуя процедуре получения соединения **4-10**, показанной на приведенной ранее схеме 4.

[0290] Получение (8-4). К раствору **8-2** (22,0 г, 49,62 ммоль) в MeCN (400 мл) добавляли DMAP (1,2 г, 9,92 ммоль). Затем добавляли **3** (5,8 г, 419,5 ммоль), смесь перемешивали при к. т. в течение 2 ч. в атмосфере N₂; TLC показывала израсходование **8-2**. Проводили концентрирование и очищение с помощью колонки с силикагелем (PE:EA=6:1) с получением **8-4** (22,0 г, 40,63 ммоль, выход 81,9%) в виде желтого масла. ESI-LCMS: масса/заряд 564 [M+Na]⁺.

[0291] Получение (8-5). К раствору **8-4** (28,0 г, 51,71 ммоль) в MeOH (400 мл) добавляли конц. водный раствор NH₄OH (28 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1,5 ч.; TLC показывала израсходование **8-4**. Проводили концентрирование и очищение с помощью колонки с силикагелем (PE:EA=10:1~2:1) с получением **8-5** (21,0 г, 42,04 ммоль, выход 81,3%) в виде желтого масла. ESI-LCMS: масса/заряд 522 [M+Na]⁺.

[0292] Получение (8-6). К раствору **8-5** (20,0 г, 40,04 ммоль) в йодэтаноле (100 мл) добавляли Ag₂O (18,6 г, 80,08 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 5 ч., после того, как LC-MS показала полное израсходование **8-5**, фильтровали с помощью диатомита и концентрировали с получением **8-6** (16,0 г, 30,33 ммоль, выход 75,7%) в виде желтого масла, которое применяли непосредственно на следующей стадии. ESI-LCMS: масса/заряд 528 [M+H]⁺.

[0293] Получение (8-7). К раствору **8-6** (16,0 г, 30,33 ммоль) в MeCN (400 мл) добавляли пирролидин (8,63 г, 121,32 ммоль, 12 мл), реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение ночи; TLC показывала полное израсходование **8-6**. Проводили концентрирование и очищение с помощью колонки с силикагелем (DCM:MeOH=100:1~50:1) с получением **7** (12,0 г, 27,94 ммоль, выход 92,1%) в виде желтого масла. ESI-LCMS: масса/заряд 430 [M+H]⁺.

[0294] Получение (8-8). К раствору **8-7** (12,0 г, 27,94 ммоль) в THF (200 мл) добавляли Pd/C (1,2 г), смесь перемешивали при к. т. в атмосфере H₂ в течение ночи. LC-MS показала полное израсходование **7**. Проводили фильтрование и промывку с помощью DCM (100 мл * 3), затем концентрирование с получением **8-8** (11,0 г, 27,27 ммоль, выход 97,6%) в виде серого твердого вещества, которое применяли непосредственно на следующей стадии. ESI-LCMS: масса/заряд 404 [M+H]⁺.

[0295] Получение (8-9). К раствору **8-8** (10,0 г, 24,79 ммоль) в DCM (80 мл) добавляли MMTrCl (11,4 г, 37,18 ммоль), 2,4,6-коллиндин (2,0 г, 16,61 ммоль, 6,5 мл) и AgNO₃ (6,3 г, 37,18 ммоль), смесь перемешивали при к. т. в течение 1,5 ч. TLC показала полное израсходование **8-8**. Проводили фильтрование и органический слой промывали водой и высушивали над Na₂SO₄, затем концентрировали и очищали с помощью колонки с силикагелем (PE:EA=5:1~1:1) с получением **8-9** (16,0 г, 23,68 ммоль, выход 95,5%) в виде светло-желтого твердого вещества.

[0296] Получение (8-10). К 1,0 н. раствору NaOH (20 мл, MeOH/H₂O=9:1)

добавляли 8-9 (4,0 г, 5,92 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 2 ч., при этом TLC показала израсходование **8-9**, концентрировали и экстрагировали с помощью DCM (20 мл * 2), органический слой высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали, остаток очищали с помощью колонки с силикагелем (DCM:MeOH=200:1~50:1) с получением **8-10** (3,0 г, 53,8 ммоль, выход 90,9) в виде белого твердого вещества.

[0297] Получение (8-11). К раствору **8-10** (2,36 г, 4,23 ммоль) в DCM (2,0 мл) добавляли DMAP (103 мг, 0,8 ммоль) и DIPEA (2,2 г, 16,92 ммоль, 2,96 мл). Затем добавляли CEPCL (1,0 г, 4,23 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 1 ч. TLC показала израсходование **8-10**, промывали с помощью насыщенного раствора NaHCO₃ (5 мл), отделяли органический слой и промывали водный слой с помощью DCM (10 мл * 2). Объединенный органический слой промывали солевым раствором, высушивали над Na₂SO₄, концентрировали и очищали с помощью Flash-Prep-HPLC с получением **8-11** (2,45 г, 3,23 ммоль, выход 76,36%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,62 (s, 1H), 7,74 (dd, J=1,4 Гц, 0,5H), 7,60-7,50 (m, 4H), 7,51-7,41 (m, 2H), 7,34- 7,16 (m, 7H), 7,12 (d, J=1,4 Гц, 0,5H), 6,88-6,76 (m, 2H), 5,66 (s, 1H), 4,37-4,23 (m, 1H), 4,16-4,05 (m, 1H), 4,05-3,94 (m, 0,5H), 3,88-3,74 (m, 4,5H), 3,72-3,35 (m, 3H), 3,22 (td, J=10,3, 4,7 Гц, 0,5H), 3,03-2,89 (m, 1,5H), 2,80-2,69 (m, 1H), 2,61 (t, J=6,5 Гц, 1H), 2,37 (td, J=6,6, 1,3 Гц, 1H), 1,97 (d, J=3,5 Гц, 0,5H), 1,91 (dd, J=11,4, 1,2 Гц, 3H), 1,52 (d, J=4,7 Гц, 0,5H), 1,29-1,17 (m, 12H), 1,08 (td, J=7,0, 4,9 Гц, 3H). ³¹P ЯМР (162 МГц, CDCl₃) δ 149,31, 147,14. ESI-LCMS: масса/заряд 576 [M+H]⁺.

Количественное определение неочищенного олигомера или анализ неочищенного материала

[0298] Образцы растворяли в деионизированной воде (1,0 мл) и проводили количественный анализ следующим образом. Сперва проводили холостое испытание с применением только воды (1,0 мл), при этом 20 мкл образца и 980 мкл воды тщательно смешивали в микроцентрифужной пробирке, переносили в кювету и получали значение поглощения при 260 нм. Неочищенный материал высушивали и хранили при -20°C.

Анализ неочищенного материала с помощью HPLC/LC-MS

[0299] 0,1 OD неочищенных образцов подвергали MS-анализу в отношении неочищенного материала. После подтверждения данных LC-MS в отношении неочищенного материала проводили стадию очистки.

Очистка с помощью HPLC

[0300] Модифицированные фосфорамидатом (NP) и тиофосфорамидатом (NPS) олигонуклеотиды с конъюгатами и без них очищали с помощью анионообменной HPLC. Буферы представляли собой 20 mM фосфат натрия в 10% CH₃CN, pH 8,5 (буфер А), и 20 mM фосфат натрия в 10% CH₃CN, 1,8 M NaBr, pH 8,5 (буфер В). Фракции, содержащие полноразмерные олигонуклеотиды, объединяли, обессоливали и лиофилизировали.

Обессоливание очищенного олигомера

[0301] Очищенный сухой олигомер затем обессоливали с применением Sephadex

G-25 M (Amersham Biosciences). Картридж трижды кондиционировали с помощью 10 мл деионизированной воды. Очищенный олигомер, полностью растворенный в 2,5 мл воды, не содержащей РНКазы, затем наносили на картридж с очень медленным элюированием по каплям. Не содержащий соли олигомер элюировали с помощью 3,5 мл деионизированной воды непосредственно во флакон с завинчивающейся крышкой.

АНАЛИЗ IN VITRO

[0302] Синтезировали антисмысловые олигонуклеотиды (ASO), нацеленные на экзон 5 MAPT человека. Синтезировали ASO с фосфотиоатной связью в химической структуре и 2'-метоксиэтильными (2'MOE) защитными группами в боковых частях длиной 5 нуклеотидов на каждом конце молекулы, и также синтезировали ASO с такой же последовательностью, нацеленной на экзон 5 MAPT с применением химической структуры с фосфорамидатной связью P5'-N3' в ASO (а не химической структуры с фосфотиоатной модификацией). Оценивали уровни mRNA MAPT в человеческих нейронах, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (iPSC), с последующей обработкой химической структурой, предусматривающей либо фосфотиоатную модификацию (OPS), либо фосфорамидатную модификацию (NPS), но с такими же 2'MOE-защитными группами в боковых частях для определения того, снижают ли и насколько эффективно уровни экспрессии mRNA тау-белка и тау-белка, а также для определения их влияния на патологию, связанную с тау-белком, в модели AD на трансгенных мышях (DeVos et al., Sci Transl Med, 2017).

ПОЛУЧЕНИЕ iPSC И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ В КОРТИКАЛЬНЫЕ НЕЙРОНЫ

[0303] Родительскую линию iPSC (Sigma, № по каталогу iPSC0028) получали путем перепрограммирования эпителиальных клеток от донора, представляющего собой женщину возрастом 24 года, с помощью четырех факторов Яманаки (Oct3/4, Sox2, Klf4 и c-Myc) с применением ретровирусных векторов. iPSC человека культивировали в отсутствие питающих клеток и вносили питательные вещества ежедневно со свежей средой mTeSR (Stem Cell Technologies). Клетки пассировали с помощью EDTA (Gibco) при конфлюэнтности и проводили дифференциацию в клетки-предшественники нейронов (NPC) и кортикальные нейроны с применением классического протокола двойного ингибирования SMAD. С помощью данного протокола главным образом образуются кортикальные глутаматергические нейроны слоя V, экспрессирующие TBR1 (прим. 20%) и STIP2 (прим. 80%). Вкратце, iPSC распределяли в суспензию отдельных клеток, и нейронную индукцию инициировали за счет последующей обработки с помощью SB431542 и дорсоморфина (среда для нейронной индукции, см. **таблицу 1**) в течение периода времени, составляющего 12 дней.

ТАБЛИЦА 1. Среда N2B27 (состав)

Компонент (конечная концентрация)	Производитель	№ по кат.
Среда Neurobasal®	Gibco	21103-049
DMEM/F-12, добавка GlutaMAX	Gibco	31331-028

Компонент (конечная концентрация)	Производитель	№ по кат.
Добавка В-27, бессывороточная (1%)	Gibco	17504-044
N-2 (0,5%)	Gibco	17502-048
Раствор заменимых аминокислот MEM (0,5%)	Gibco	11140-035
Пируват натрия (0,5 мМ)	Gibco	11360-070
Добавка GlutaMAX™ (0,5%)	Gibco	35050-038
Пенициллин-стрептомицин (10 Ед./мл)	Gibco	15140-122
2-Меркаптоэтанол (25 мкМ)	Gibco	31350-010
Раствор инсулина человека (2,4 мкг/мл)	Sigma	I9278

[0304] После индукции клетки-предшественники нейронов (NPC) обрабатывали диспазой и еще три раза пересевали для увеличения их количества (примерно в дни 17, 20 и 25). Между днями 25 и 30 готовили исходные растворы на основе замороженных NPC в среде для замораживания предшественников нейронов (см. **таблицу 2**) и хранили в жидком азоте для дальнейших экспериментов. NPC размораживали в среде для восстановления NPC (см. **таблицу 3**) и хранили в течение трех дней в культуре перед окончательным пересевом для обработки с помощью ASO.

ТАБЛИЦА 2. Среда для нейронной индукции (состав)

Компонент (конечная концентрация)	Производитель	№ по кат.
Среда N2B27		
Дорсоморфин (1 мкМ)	Tocris	3093
SB431542 (10 мкМ)	Sigma	S4317

ТАБЛИЦА 3. Среда для восстановления нейронов (состав)

Компонент (конечная концентрация)	Производитель	№ по кат.
Среда N2B27		
Ингибитор Rock Y-27632 (10 мкМ)	Sigma	Y0503
Рекомбинантный белок FGF-Basic (AA 10-155) человека (20 нг/мл)	Gibco	RHG0024

[0305] NPC высевали в среде N2B27 (см. **таблицу 3**) при плотности 15000 клеток на лунку в покрытых полиорнитинном/ламинином (Sigma) 96-луночных планшетах.

[0306] Для блокирования клеточной пролиферации клетки подвергали двум обработкам с помощью 10 мкМ N-[N-(3,5-дифторфенацетил)-L-аланил]-S-фенилглицин-трет-бутилового сложного эфира (DAPT, Sigma) в дни 7 и 11 после посева. Через 14 дней после размораживания среду N2B27 заменяли конечной средой для дифференциации (см. **таблицу 4**), которую меняли 2-3 раза на неделю (50%) до дня 15 или 25, если проводили обработки с помощью ASO.

ТАБЛИЦА 4. Конечная среда для дифференциации в нейроны (состав)

Компонент (конечная концентрация)	Производитель	№ по кат.
Среда N2B27		
Рекомбинантный белок BDNF человека/мышь/крысы/собаки/коня (20 нг/мл)	R&D Systems	248-BD
Рекомбинантный белок GDNF человека (10 нг/мл)	R&D Systems	212-GD
Натриевая соль циклического N-6,2'-O-дибутириладенозин-3',5'-монофосфата (500 мкМ)	Sigma	D0627
L-Аскорбиновая кислота (200 мкМ)	Sigma	A5960
DAPT (10 мкМ)	Sigma	D5942

ОБРАБОТКА АНТИСМЫСЛОВЫМ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОМ (ASO) ДЛЯ ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА MRNA MAPT.

[0307] ASO синтезировали как полный фосфотиоат (OPS), как известно из уровня техники. Синтез ASO с тиофосфорамидатной модификацией (NPS) проводили в соответствии с настоящим изобретением. ASO с NPS-модификацией содержали нуклеозиды, связанные посредством NPS в 5 нуклеотидах на каждом конце ASO, и центральный мостик длиной 10 нуклеотидов с OPS-связанными нуклеотидами. Как в случае ASO с OPS-модификацией, так и ASO с NPS-модификацией боковые части длиной 5 нуклеотидов на каждой стороне ASO содержали 2'-метоксиэтильные (МОЕ) защитные группы. ASO восстанавливали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) (Sigma) и определяли значения их конечной концентрации по закону Бера-Ламберта, измеряя их поглощение при 260 нм. ASO для взаимодействия с MAPT длиной 20 нуклеотидов со следующей последовательностью: GCTTTTACTGACCATGCGAG (SEQ ID NO: 1) модифицировали так, что он содержал 2'-МОЕ-замещения и фосфотиоатные (OPS) связи (OPS-модифицированная контрольная SEQ ID NO: 1) и модифицировали так, что он содержал 2'-МОЕ-замещения и тиофосфорамидатные (NPS) связи (NPS-модифицированная SEQ ID NO: 1). В качестве отрицательного контроля использовали ненацеленный ASO со случайной перестановкой нуклеотидов со следующей последовательностью: CCTCCCTGAAGGTTCTCC (контроль, не взаимодействующий с MAPT). Полученные из iPSC человека кортикальные нейроны обрабатывали путем свободной доставки ASO при указанных дозах и в течение указанных промежутков времени.

Таблица 5

Последовательность	Последовательности

OPS- модифицирующая контрольная SEQ ID NO: 1	5'- moeGps(5m)moeCps(5m)moeUps(5m)moeUps(5m)moeUpsTpsAps(5m)CpsTpsGpsAps(5m)Cps(5m)CpsApsTpsmoeGps(5m)moeCpsmoeGps moeApsmoeG-3'
NPS- модифицирующая SEQ ID NO: 1	5'- moeGnpsmoeCnpsmoeUnpsmoeUnpsmoeUnpsTpsAps(5m)CpsTpsGpsAps(5m)Cps(5m)CpsApsTpsmoeGnpsmoeCnpsmoeGnps moeAnpsmoeGn-3'

ВЫДЕЛЕНИЕ РНК И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ РСР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ.

[0308] РНК выделяли с применением набора RNeasy96® (Qiagen) в соответствии с инструкциями изготовителя. Вкратце, авторы настоящего изобретения подвергали клетки лизису путем добавления 150 мкл буфера RLT и встряхивания на орбитальном шейкере в течение 30 мин. с последующим добавлением равного объема 70% (об./об.) этанола. Затем смесь переносили в колонки, и РНК связывалась с фильтром посредством центрифугирования при 5600 x g в течение 4 мин. при к. т. с применением центрифуги Sigma 4-18K. Все стадии серийной промывки с помощью буфера RW1 (700 мкл, 4 мин), буфера RPE (700 мкл, 4 мин.) и второй стадии с использованием буфера RPE (700 мкл, 10 мин.) проводили при 5600 x g при к. т. РНК элюировали с применением 60 мкл воды, не содержащей нуклеазу, путем центрифугирования при 5600 x g при к. т. в течение 4 мин. Концентрацию РНК определяли с помощью спектроскопии с применением Nanodrop® ND-8000 (ThermoFisher). Равные количества РНК подвергали обратной транскрипции с применением высокоэффективного набора для обратной транскрипции cDNA (ThermoFisher) в конечном объеме реакционной смеси, составляющем 20 мкл, в соответствии с инструкциями изготовителя. После 10 мин. инкубации при 25°C происходила обратная транскрипция в течение 2 часов при 37°C с последующей инактивацией фермента при 85°C в течение 5 мин. Для количественного определения общих уровней mRNA MAPT cDNA разбавляли в соотношении 1:10, смешивали с мастермиксом 2X Power SYBR™ Green Plus (ThermoFisher) и праймерами ДНК до конечного объема реакционной смеси 10 мкл. Для определения общего содержания mRNA MAPT применяли следующие праймеры при конечной концентрации 500 нМ (**таблица 6**).

Таблица 6

ID для анализа	Прямая	Обратная
MART_B01	ССТССААГТГТГГСТСАТТА	СААТСТТСТГАСТГГАСТСТГ
MART_B02	САГТГГТСССТАСТССА	ТГГАСТТГАСАТТСТТСАГГ
MART_B04	АТТГАААСССАААГСТГАС	ГАГГАГАСАТТГСТГАГАТГ
MART_B06	ТСАГГТГААСТТТГААССАГ	СТТССАТСАСТТСТГААСТСС
MART_JPNV-1	ССААГТГТГГСТСАТТАГГСА	ССААТСТТСТГАСТГГАСТСТГТ
MART_JPNV-2	ГАГТССАГТСТГААГАТТГГГТ	ГГСТГАГТСТАССАТГТСТГАТГ
3R MART	АГГСТГГААГГТГСАААТА	ГССАСТСТТГГТТТАТГАТГ
4R MART	СТГГААГГТГСАГАТААТТА	ТАТТТГСАСАСТГСССТ
	А	

Также проводили анализы на амплификацию 8 разных конститутивных генов с применением праймеров ДНК (см. **таблица 8**). Все праймеры ДНК приобретали у Integrated DNA Technologies. Реакции RT-qPCR проводили на термоциклере HT7900 (Applied Biosystems) с применением стандартных параметров цикла. Специфичность праймеров ДНК подтверждали с применением анализа кривой плавления. Анализ GeNorm применяли для определения наиболее устойчивых конститутивных генов с применением qBase+ (Biogazelle). Все данные нормализовали относительно геометрического среднего наиболее устойчивых конститутивных генов и калибровали относительно контрольных условий.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ALPHALISA®

[0309] Клетки подвергали лизису в течение 30-60 мин. в 96-луночных планшетах для культивирования при комнатной температуре (к. т.) в орбитальном шейкере с применением 40 мкл на лунку буфера RIPA (Sigma), содержащего ингибиторы фосфатазы (PhosSTOP™, Roche) и ингибиторы протеазы (cOmplete™, Roche). Для количественного определения общего содержания тау-белка применяли комбинацию антител HT7 (ThermoFisher) и hTAU10 (Janssen) с применением технологии AlphaLISA® (PerkinElmer). Измерения проводили в трех повторностях, каждый раз применяя по 5 мкл разбавленного 1:3 лизата. Каждый образец переносили в 384-луночный аналитический планшет для реакции согласно анализу AlphaLISA®, в котором 5 мкл клеточных экстрактов инкубировали в течение 2 часов при к. т. со смесью биотинилированного антитела и акцепторных гранул (см. **таблицу 7**).

ТАБЛИЦА 7. Концентрация антител и гранул, применяемых в анализе AlphaLISA® (значения конечной концентрации)

Компонент	Конечная концентрация
Биотинилированный Ab (HT7)	1,2 нМ
Акцепторные гранулы (hTAU10)	10 мкг/мл

Донорные гранулы	30 мкг/мл
------------------	-----------

[0310] Затем в лунки добавляли донорные гранулы и инкубировали при к. т. в течение 30 мин., прежде чем считывать при 615 нм (при возбуждении, 680 нм) на планшет-ридере EnVision (Perkin Elmer).

Количественное определение общего содержания белка

[0311] Количественное определение общего содержания белка проводили с применением набора Vicinichonic Acid Kit (Sigma). Чтобы оценить превосходство химической структуры с NPS-модификацией по сравнению с химической структурой с OPS-модификацией, полученные из iPSC человека кортикальные нейроны обрабатывали с помощью ASO для взаимодействия с MAPT в различных концентрациях. ASO для взаимодействия с MAPT добавляли непосредственно в среду для культивирования в день 25 после инициации процесса дифференциации до значений конечной концентрации, находящихся в диапазоне от 1,25 мкМ до 10,0 мкМ. В качестве отрицательного контроля применяли эквимоларные концентрации ненацеленного контрольного ASO с такой же химической структурой. Через 5 дней определяли относительные общие уровни mRNA MAPT с помощью RT-qPCR (таблица 8).

ТАБЛИЦА 8. Праймеры ДНК для конститутивных генов

Название конститутивного гена	Прямой/обратный праймер	Последовательность праймера (от 5' до 3')
GAPDH	Прямой	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC
	Обратный	GGGGTCATTGATGGCAACAATA
RNF20	Прямой	TTATCCCGGAAGCTAAACAGTGG
	Обратный	GTAGCCTCATATTCTCCTGTGC
VIPAR	Прямой	GGGAGACCCAAAGGGGAGTAT
	Обратный	GGAGCGGAATCTCTCTAGTGAG
SCLY	Прямой	ACTATAATGCAACGACTCCCCT
	Обратный	CTTCCTGCTGAATACGGGCTG
PRDM4	Прямой	CACCTCCACAGTACATCCACC
	Обратный	TGATAGGGATCTAGTGCTGAAGG
ENOX2	Прямой	TCATTGTGGAAGTTTTTCGAGCA
	Обратный	TGCGGTAACCAGACAGATACA
UBE4A	Прямой	TAGCCGCTCATTCGGATCAC
	Обратный	GGGATGCCATTCCCGCTTT
ERCC6	Прямой	TCACGTCATGTACGACATCCC
	Обратный	GTGGCAGCTTGAGGGCTAAG

[0312] Оба отрицательных контрольных ASO не влияли на общие уровни mRNA

МАРТ (таблица 9).

ТАБЛИЦА 9. Относительные общие уровни mRNA МАРТ после обработки с помощью ASO

SEQ ID NO:	Модификация ASO	Концентрация ASO (мкМ)	Относительные уровни mRNA МАРТ (среднее значение \pm SD) (% относительно 0 мкМ)
OPS- модифицированная контрольная SEQ ID NO: 1	OPS, 2'МОЕ, МАРТ	0,00	124,0 \pm 40,7
		1,25	130,7 \pm 21,4
		2,5	131,0 \pm 14,6
		5,0	72,9 \pm 8,0
		10,0	42,3 \pm 2,7
NPS- модифицированная SEQ ID NO: 1	NPS, 2'МОЕ, МАРТ	0,00	97,5 \pm 7,2
		1,25	55,0 \pm 3,3
		2,5	48,6 \pm 7,0
		5,0	40,5 \pm 7,8
		10,0	22,5 \pm 2,5
OPS- модифицированный контроль, не взаимодействующий с МАРТ	OPS, 2'МОЕ, контроль, не взаимодействующий с МАРТ	0,00	103,6 \pm 14,2
		1,25	94,2 \pm 7,2
		2,5	94,4 \pm 9,2
		5,0	93,5 \pm 11,4
		10,0	83,6 \pm 11,0
NPS- модифицированный контроль, не взаимодействующий с МАРТ	NPS, 2'МОЕ, контроль, не взаимодействующий с МАРТ	0,00	97,3 \pm 4,0
		1,25	82,4 \pm 13,7
		2,5	87,6 \pm 18,9
		5,0	105,6 \pm 10,9
		10,0	113,6 \pm 13,2

[0313] ASO с NPS-модификацией снижали общие уровни mRNA МАРТ в 2 раза относительно количества ASO с OPS-модификацией, как отобразено в таблице 8.

[0314] С целью оценить, являются ли ASO с NPS-модификацией для взаимодействия с МАРТ также более эффективными в снижении уровней тау-белка по сравнению с ASO с OPS-модификацией для взаимодействия с МАРТ, полученные из iPSC человека кортикальные нейроны обрабатывали, начиная в день 15 после инициации

дифференциации, и добавляли ASO каждые 5 дней в течение в общей сложности 15 дней. Данный способ обработки необходим, поскольку считается, что период полужизни тау-белка очень длительный с учетом его функции в стабилизации микротрубочек, в частности, в нейронах с их длинными аксонами. После данного пролонгированного периода обработки с помощью ASO клетки подвергали лизису и оценивали уровни тау-белка с помощью основанных на использовании гранул иммуноанализов (таблица 10).

ТАБЛИЦА 10. Относительные общие уровни тау-белка, определенные с помощью AlphaLISA® после обработки с помощью ASO

SEQ ID NO:	Модификация ASO	Концентрация ASO (мкМ)	Относительные уровни тау-белка (среднее значение \pm SD) (% относительно 0 мкМ)
OPS-модифицированная контрольная SEQ ID NO: 1	OPS, 2'МОЕ, MAPT	0,00	100,0 \pm 19,9
		1,25	73,1 \pm 16,6
		2,5	77,9 \pm 8,7
		5,0	50,2 \pm 10,1
		10,0	39,9 \pm 4,8
NPS-модифицированная SEQ ID NO: 1	NPS, 2'МОЕ, MAPT	0,00	100,0 \pm 16,9
		1,25	40,9 \pm 12,7
		2,5	31,7 \pm 6,3
		5,0	17,6 \pm 3,2
		10,0	19,6 \pm 1,6
OPS-модифицированной контроль, не взаимодействующий с MAPT	OPS, 2'МОЕ, контроль, не взаимодействующий с MAPT	0,00	100,0 \pm 16,4
		1,25	81,7 \pm 13,4
		2,5	94,9 \pm 16,3
		5,0	74,5 \pm 8,5
		10,0	90,4 \pm 17,4
NPS-модифицированной контроль, не взаимодействующий с MAPT	NPS, 2'МОЕ, контроль, не взаимодействующий с MAPT	0,00	100,0 \pm 11,3
		1,25	104,9 \pm 40,9
		2,5	86,3 \pm 32,8
		5,0	55,7 \pm 28,5
		10,0	106,2 \pm 19,9

[0315] ASO в качестве отрицательного контроля не влияли на уровни тау-белка. Однако ASO с NPS-модификацией для взаимодействия с MAPT дозозависимым образом снижали уровни тау-белка в 2 раза относительно ASO с OPS-модификацией для

взаимодействия с MAPT, как отображено в таблице 9.

[0316] Исходя из данных примеров, неожиданно определили, что ASO для взаимодействия с MAPT с химической структурой с NPS-модификацией являются превосходными в снижении общего содержания mRNA MAPT и уровней тау-белка у полученных из iPSC человека нейронах по сравнению с ASO с такой же последовательностью, но с химической структурой с OPS-модификацией.

Анализ с помощью IEX HPLC и LC/MS с электрораспылением

Исследование на стабильность олигонуклеотидов, образующих комплекс

[0317] Примерно 0,10 OD олигомера растворяли в воде и затем отмеряли пипеткой в специальные флаконы для проведения анализа с помощью IEX-HPLC и LC/MS. С помощью аналитической HPLC и LC-MS с ES подтверждали целостность олигонуклеотидов.

[0318] В вариантах осуществления раскрытые олигонуклеотиды продемонстрировали повышенную аффинность в отношении целевой последовательности нуклеиновой кислоты по сравнению с немодифицированным олигонуклеотидом, содержащим такую же последовательность. Например, в некоторых последовательностях раскрытые олигонуклеотиды имеют последовательность нуклеиновых оснований, которая комплементарна целевой последовательности нуклеиновой кислоты и гибридизируется с ней с более высокой аффинностью, нежели немодифицированный олигонуклеотид, содержащий такую же последовательность. В вариантах осуществления раскрытый олигонуклеотид, образующий комплекс/гибридизированный с комплементарной целевой последовательностью нуклеиновой кислоты характеризуется температурой плавления $T_m > 37^\circ\text{C}$. Дуплекс/комплекс может быть образован при физиологических условиях или близких к физиологическим условиям, таких как в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). В вариантах осуществления T_m дуплекса/комплекса составляет более 50°C . В вариантах осуществления T_m дуплекса/комплекса составляет $50-100^\circ\text{C}$. В вариантах осуществления T_m раскрытого олигонуклеотида, образующего дуплекс с целевой последовательностью нуклеиновой кислоты при физиологических условиях или близких к физиологическим условиям, составляет $> 50^\circ\text{C}$.

[0319] Стабильность дуплекса на основе раскрытых олигонуклеотидов при связывании с целевой последовательностью РНК оценивали с применением данных термической диссоциации дуплексов. Исследования на термическую диссоциацию проводили путем измерения зависящего от температуры поглощения УФ-излучения при 260 нм дуплексов с применением спектрометра Shimadzu UV2600, подсоединенного к регулятору температуры Shimadzu и термостатируемой ванне F12-ED Julabo. Раскрытый олигонуклеотид и целевую последовательность нуклеиновой кислоты смешивали в эквимольном соотношении с получением конечной концентрации дуплекса 2 мкМ. Все образцы получали в условиях 1 x PBS-буфера (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na_2HPO_4 , 1,8 мМ KH_2PO_4 , pH 7,2). Поглощение в УФ-видимой области спектра при 260 нм регистрировали и корректировали с применением поглощения при 380 нм (длина пути в

ячейке для УФ-излучения=1 см). Данные записывали со скоростью 1°C/мин. с интервалами в 1°C как для прогонов с нагреванием (20-95°C), так и с охлаждением (95-20°C). Значения T_m определяли путем взятия первой производной сигмоидальных профилей нагревания с применением программного обеспечения для анализа T_m LabSolutions. Конечное значение T_m представляет собой среднее значение трех независимых испытаний, и значения погрешности являются среднеквадратическим отклонением. Как представлено в **таблице 11**, NPS-модифицированная SEQ ID NO: 1 характеризуется $T_m \sim +0,8^\circ\text{C}$ на 3'-NH.

Таблица 11

SEQ ID NO:	Модификация ASO	T_m с РНК (°C)
OPS-модифицированная контрольная SEQ ID NO: 1	OPS, 2'МОЕ, МАРТ	62,4 ($\pm 0,6$)
NPS-модифицированная SEQ ID NO: 1	NPS, 2'МОЕ, МАРТ	68,8 ($\pm 0,5$)

Проверка эффективности GAPmer для тау-белка

[0320] Для оценки эффективности GAPmer для тау-белка линию нервных клеток человека (клетки KELLY) обрабатывали различными концентрациями, находящимися в диапазоне от 80 нМ до 20 мкМ. Оценивали два варианта главных GAPmer: 2'-О-метил (2'ОМе) и 2'-О-метоксиэтил (2'МОЕ). Такие GAPmer представлены в форме 5-10-5, причем это означает, что первые и последние 5 нуклеотидов включают NPS и химические структуры с 2'-группой, и средние 10 нуклеотидов представляют собой “мостик” с химической структурой с OPS-модификацией. Через три дня после начала обработки собирали общую РНК и оценивали уровни общей mRNA тау-белка с помощью RT-qPCR с применением 6 разных анализов (см. таблицу 6). В обработанных клетках оценивали экспрессию mRNA тау-белка с 3R и 4R с помощью RT-qPCR (см. таблицу 6).

Таблица 12

GAPmer	Химическая структура связи Химическая структура для 2'-О	Последовательность ASO	Целевой сайт ASO
A	NPS- <u>OPS</u> -NPS 2'МОЕ	GCUUUTTTGTCATCGCUUCC	Экзон 5
B	NPS- <u>OPS</u> -NPS 2'ОМе		
C	NPS- <u>OPS</u> -NPS 2'МОЕ	UUGAUATTATCCTTTGAGCC	Экзон 10
D	NPS- <u>OPS</u> -NPS 2'ОМе		

E	NPS- <u>OPS</u> -NPS 2'МОЕ	GGUGATATTGTCCAGGGACC	Экзон 12
F	NPS- <u>OPS</u> -NPS 2'ОМе		

[0321] Все GAPmer показали дозозависимое снижение общей экспрессии mRNA тау-белка с 3R и 4R дозозависимым образом. GAPmer C и D, которые целенаправленно воздействуют на экзон 10 mRNA тау-белка, были более эффективными в снижении уровней mRNA тау-белка с 4R по сравнению с другими GAPmer.

Для подтверждения того, что такие GAPmer также снижают уровни mRNA тау-белка в нейронах человека, такой же эксперимент проводили в отношении полученных из iPSC человека нейронах и обрабатывали такие клетки в течение 72 часов с помощью таких же GAPmer. Весьма подобные результаты получали для каждого из GAPmer в полученных из iPSC нейронах по сравнению с клеткой KELLY.

Биораспределение GAPmer

[0322] Дополнительные GAPmer ASO синтезировали с немодифицированной химической структурой, а также с химической структурой с NPS-модификацией. ID, химическая структура, последовательности и целевой сайт таких ASO перечислены в таблице 13. Такие GAPmer представлены в форме 5-10-5, причем это означает, что первые и последние 5 нуклеотидов включают связь и химические структуры с 2'-группой, и средние 10 нуклеотидов представляют собой "мостик" с химической структурой с OPS-модификацией. С целью оценить, характеризуется ли GAPmer с NPS-модификацией для тау-белка отличающимся/превосходящим профилем биораспределения, GAPmer E вводили радиоактивный изотоп - йод-125. Подобный подход применяли для введения в GAPmer G радиоактивного изотопа - йода-125.

Таблица 13

GAPmer	Химическая структура связи Химическая структура для 2'-О	Последовательность ASO	Целевой сайт ASO
G	OPS/OPO- <u>OPS</u> -OPS/OPO 2'МОЕ	CCGTTTTCTTACCACCCT	Инtron 9
H	NPS/NPO- <u>OPS</u> -NPS/NPO 2'МОЕ	CCGUUTTCTTACCACCCU	
I	NPS- <u>OPS</u> -NPS 2'МОЕ	CCGUUTTCTTACCACCCU	

[0323] Меченные радиоактивным изотопом соединения вводили крысам с помощью интратекальной болюсной инъекции и выполняли визуализацию животных 4 раза в течение первого часа после инъекции с последующим получением изображений в 6

часов и 24 часа, а также в 7 день и 14 день после инъекции с применением однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (СПЕКТ/СТ). Результаты данного исследования на биораспределение указывают на то, что сравнительный GAPmer G перемещается быстрее к головному мозгу, однако быстро выводится из головного мозга с достижением уровня устойчивого состояния через 6-24 часа после инъекции (таблицы 14-15). По видимому, GAPmer E медленнее перемещается к головному мозгу, однако достигает более высоких уровней устойчивого состояния в головном мозге по сравнению со сравнительным GAPmer G (таблицы 14-15). Кроме того, по видимому, GAPmer E удерживается в течение более длительного периода времени в разных участках ЦНС (включая более глубокие участки головного мозга и спинной мозг) по сравнению со сравнительным GAPmer G (таблицы 14-15). И в заключение, данное исследование указывает на то, что нацеленный на тау-белок GAPmer E характеризуется значениями более длительного времени удерживания в ЦНС грызунов по сравнению со сравнительным GAPmer G.

Таблица 14**GAPmer E**

Время (ч.)		0	0,25	0,5	0,75	6	24	168	336
Процент ID в CSF цервикального отдела (% ID)	Среднее значение	10,8321	8,47327	7,19433	6,66709	1,25181	0,865811	0,537386	0,284057
	SEM	0,866516	0,97213	1,1427	1,15989	0,181687	0,200669	0,260395	0,193775
Процент ID/г в CSF цервикального отдела (% ID/г)	Среднее значение	76,27	59,4654	50,4656	46,7394	9,35959	6,01616	3,29889	1,55895
	SEM	5,46944	5,69153	7,4367	7,62121	1,20537	1,20406	1,55303	1,02219
Процент ID в CSF люмбального отдела (% ID)	Среднее значение	0,578109	0,77805	0,723477	0,543578	0,357861	0,301755	0,205616	0,147592
	SEM	0,083627	0,162685	0,065018	0,099339	0,089864	0,085314	0,072481	0,066745
Процент ID/г в CSF	Среднее значение	9,35819	12,5983	11,6298	8,69566	5,99358	4,74398	2,40874	1,49488

люмбального отдела (% ID/г)									
	SEM	1,63028	2,93894	1,32603	1,6503	1,66635	1,3636	1,00223	0,783811
Процент ID в CSF торакального отдела (% ID)	Среднее значение	6,95045	7,05609	6,70884	6,29832	1,53496	0,770341	0,287605	0,064824
	SEM	0,882792	0,607619	0,426338	0,308317	0,254473	0,100461	0,065515	0,036388
Процент ID/г в CSF торакального отдела (% ID/г)	Среднее значение	40,8075	41,4428	39,4093	37,017	9,19442	4,52467	1,48717	0,316396
	SEM	4,87729	3,1295	1,91031	1,26842	1,46663	0,519338	0,352275	0,18884
Процент ID в глубоких шейных лимфатически х узлах (% ID)	Среднее значение	0,002162	0,015821	0,02634	0,027323	0,250848	0,304756	0,266843	0,259165
	SEM	0,001526	0,010442	0,018233	0,016429	0,046625	0,020172	0,026647	0,053091
Процент ID/г в глубоких шейных лимфатически х узлах (% ID/г)	Среднее значение	0,078184	0,572226	0,952703	0,988237	9,07292	11,0227	9,65144	9,37372
	SEM	0,055195	0,37767	0,659483	0,594218	1,68638	0,729592	0,963801	1,92026
Процент ID в	Среднее	0	0	5,74E-	5,98E-	0,02263	0,00349	0,00246	0

сердце (% ID)	значение			05	06	3	5	9	
	SEM	0	0	5,74E-05	3,85E-06	0,018774	0,001487	0,00104	0
Процент ID/г в сердце (% ID/г)	Среднее значение	0	0	3,41E-05	3,55E-06	0,013466	0,002102	0,00132	0
	SEM	0	0	3,41E-05	2,29E-06	0,01117	0,000884	0,000537	0
Процент ID в левой почке (% ID)	Среднее значение	0	0,2285	1,48109	3,79931	13,2502	14,9802	14,8239	14,6498
	SEM	0	0,2285	0,836824	0,946707	0,551601	0,182297	0,319957	0,404948
Процент ID/г в левой почке (% ID/г)	Среднее значение	0	0,120413	0,780397	2,00179	6,98143	7,89354	7,81194	7,71641
	SEM	0	0,120413	0,440991	0,498757	0,29024	0,096685	0,171932	0,214333
Процент ID в печени (% ID)	Среднее значение	0	6,83E-06	0,034992	0,427209	2,2748	2,27037	1,5343	0,577397
	SEM	0	6,83E-06	0,03359	0,225124	0,179946	0,130887	0,052462	0,214105
Процент ID/г в печени (% ID/г)	Среднее значение	0	6,62E-06	0,033893	0,413791	2,20335	2,19906	1,48612	0,559262
	SEM	0	6,62E-06	0,032535	0,218053	0,174294	0,126776	0,050804	0,207381
Процент ID в правой почке (% ID)	Среднее значение	0	0,534098	2,54753	4,46871	13,0671	15,5683	14,6128	14,4735
	SEM	0	0,534098	0,871366	0,684733	0,939278	0,407473	0,264569	0,543962
Процент ID/г в правой почке (% ID/г)	Среднее значение	0	0,278768	1,32942	2,33193	6,81815	8,12938	7,625	7,45214

почке (% ID/г)									
	SEM	0	0,278768	0,454796	0,357303	0,490355	0,212582	0,136791	0,246694
Процент ID в поверхностных шейных лимфатических узлах (% ID)	Среднее значение	0	0,046892	0,076572	0,061611	0,145891	0,202045	0,1679	0,136729
	SEM	0	0,043098	0,061371	0,044305	0,030862	0,059684	0,02844	0,024512
Процент ID/г в поверхностных шейных лимфатических узлах (% ID/г)	Среднее значение	0	3,41878	5,5827	4,49193	10,6365	14,7306	12,2412	9,96856
	SEM	0	3,14216	4,47443	3,23018	2,25008	4,35143	2,07352	1,78707
Процент ID в целом головном мозге (% ID)	Среднее значение	22,6306	18,8312	16,329	14,815	8,66836	7,84457	6,01653	5,66245
	SEM	1,68624	1,35974	1,61868	1,73388	0,673152	0,358564	0,670171	0,594421
Процент ID/г в целом головном мозге (% ID/г)	Среднее значение	13,6667	11,3745	9,8642	8,95243	5,23969	4,71044	3,37774	2,9616
	SEM	1,05573	0,870626	1,01123	1,08442	0,4077	0,215852	0,355915	0,271713

Сравнительный GAPmer G

Время (ч.)		0	0,25	0,5	0,75	6	24	96	168	336
Процент ID	Средне	11,152	9,780289	9,14125	8,59638	1,9599	1,31077	1,13882	1,2578	1,00442

Время (ч.)		0	0,25	0,5	0,75	6	24	96	168	336
в CSFe цервикальн значен ого отделаие (% ID)										
	SEM	0,71564 1	0,79560 5	1,21719	1,38085	0,11163 1	0,09948 7	0,19952 4	0,07958 3	0,05646 7
Процент ID/г в CSFe цервикальн значен ого отделаие (% ID/г)	Средне	69,7207	61,0495	57,0796	53,7526	13,4481	9,02884	6,94062	7,68471	5,66153
	SEM	5,26996	5,0583	7,88092	9,14163	1,06733	0,71390 6	0,92722 6	0,47960 1	0,22366 7
Процент ID в CSFe люмбальног значен о отдела (%ие ID)	Средне	2,11315	2,30045	2,20845	2,08811	0,87620 4	0,63522 9	0,62096 4	0,61429 1	0,54585 9
	SEM	0,61835 2	0,65277 7	1,03885	1,15341	0,41264 8	0,25084 9	0,31011 1	0,32343	0,30890 2
Процент ID/г в CSFe люмбальног значен о отдела (%ие ID/г)	Средне	24,3213	26,6065	25,1407	23,8978	11,1123	8,07892	6,36672	5,77421	3,99638
	SEM	3,8726	4,01662	8,94291	10,8027	4,14563	2,4462	2,55276	2,66268	1,97635
Процент ID в CSFe торакальн значен о отдела (%ие ID)	Средне	10,9876	11,8052	11,3563	10,3865	3,01616	1,81053	1,62123	1,69423	1,29347
	SEM	1,59735	2,20522	2,52628	2,30952	0,80276 4	0,51392 7	0,56476 7	0,63754 4	0,60702

Время (ч.)		0	0,25	0,5	0,75	6	24	96	168	336
Процент ID/г в CSFe торакальног о отдела (% ID/г)	Средне значе	61,5725	66,1599	63,7407	58,4808	16,3486	9,67105	8,15431	7,78233	5,39928
	SEM	8,52219	12,087	14,1188	13,1369	4,11143	2,56419	2,62432	2,70691	2,47457
Процент ID в глубоких шейных лимфатичес ких узлах (% ID)	Средне значе	0,002608	0,003654	0,00735	0,01125	0,230341	0,309695	0,314805	0,297415	0,277717
	SEM	0,000961	0,002209	0,005015	0,004754	0,024656	0,015466	0,021357	0,029098	0,032069
Процент ID/г в глубоких шейных лимфатичес ких узлах (% ID/г)	Средне значе	0,09433	0,132166	0,265826	0,406905	8,33121	11,2014	11,3862	10,7572	10,0447
	SEM	0,034745	0,079915	0,18137	0,171952	0,891567	0,559385	0,772444	1,05244	1,15989
Процент ID в сердце (% ID)	Средне значе	0	0	0	2,83E-07	0,000858	0,000364	6,15E-05	1,19E-05	0
	SEM	0	0	0	2,83E-07	0,000396	0,000262	5,77E-05	8,74E-06	0
Процент ID/г в сердце (% ID/г)	Средне значе	0	0	0	1,73E-07	0,000514	0,000219	3,66E-05	7,10E-06	0

Время (ч.)		0	0,25	0,5	0,75	6	24	96	168	336
	SEM	0	0	0	1,73E-07	0,000238	0,000159	3,43E-05	5,20E-06	0
Процент ID в левой почке (% ID)	Среднее значение	0	0	0	1,98E-07	6,350879	9,577377	8,883567	8,419033	7,180537
	SEM	0	0	0	1,98E-07	0,425138	0,291836	0,104607	0,091393	0,192997
Процент ID/г в левой почке (% ID/г)	Среднее значение	0	0	0	1,04E-07	3,345595	5,046366	4,681527	4,436533	3,783547
	SEM	0	0	0	1,04E-07	0,224155	0,153666	0,054821	0,048046	0,101955
Процент ID в печени (% ID)	Среднее значение	0	7,87E-07	0,049536	0,236671	2,227544	2,189545	2,157272	1,721292	0,679184
	SEM	0	7,87E-07	0,049536	0,236671	0,331124	0,179805	0,143902	0,194392	0,131306
Процент ID/г в печени (% ID/г)	Среднее значение	0	7,62E-07	0,047987	0,229237	2,157584	2,120778	2,089512	1,667237	0,657853
	SEM	0	7,62E-07	0,047987	0,229237	0,320724	0,174158	0,139382	0,188287	0,127182
Процент ID в правой почке (% ID)	Среднее значение	0	5,51E-07	0,033433	0,300966	6,554839	9,282322	9,072766	8,788833	7,033097
	SEM	0	5,51E-07	0,033433	0,300966	0,405522	0,237102	0,498129	0,135909	0,145122
Процент	Среднее значение	0	2,87E-07	0,017444	0,157033	3,419966	4,843355	4,734055	4,586433	3,670666

Время (ч.)		0	0,25	0,5	0,75	6	24	96	168	336
ID/г правой почке ID/г)	ве значен (%ие		07	3	9					
	SEM	0	2,87E- 07	0,01744 3	0,15703 9	0,21193 9	0,12403 3	0,25971 8	0,07054 3	0,07538 2
Процент в поверхност ных шейных лимфатичес ких узлах (% ID)	Средне ве значен ие	0	0	0	0	0,08363 4	0,11928 3	0,08981 5	0,07956 2	0,06550 6
	SEM	0	0	0	0	0,00954 2	0,00316 5	0,01099	0,00995 8	0,01289 3
Процент ID/г поверхност ных шейных лимфатичес ких узлах (% ID/г)	Средне ве значен ие	0	0	0	0	6,09754	8,69663	6,54821	5,8007	4,77585
	SEM	0	0	0	0	0,69571 8	0,23075 9	0,80127 6	0,72599 8	0,93996 8
Процент в головном мозге ID)	Средне целоме значен (%ие	6,64123	9,64981	11,2795	12,5369	12,9323	11,3917	10,9299	10,5087	9,42048
	SEM	2,56605	2,14697	1,5151	1,90975	1,21462	0,92636 8	1,03752	0,78706 1	0,87842 4

Время (ч.)		0	0,25	0,5	0,75	6	24	96	168	336
Процент ID/г в целом головном мозге (% ID/г)	Среднее значение	3,88961	5,63422	6,57098	7,29032	7,62932	6,62764	6,20152	5,81735	4,91559
	SEM	1,53724	1,29676	0,90146	1,07932	0,68357	0,49343	0,51978	0,38773	0,39317
				5		5	8	5		8

Таблица 15**GAPmer E**

Время (ч.)		0	0,25	0,5	0,75	6	24	168	336
Процент ID в миндалевидном теле (% ID)	Среднее значение	0,55825	0,46560	0,37438	0,36360	0,19367	0,14592	0,16240	0,13218
		4	8	7	4	1	5	3	9
	SEM	0,14648	0,08588	0,06135	0,06376	0,01351	0,01971	0,01841	0,03282
		6	7	5			2	5	
Процент ID/г в миндалевидном теле (% ID/г)	Среднее значение	12,4998	10,4293	8,40708	8,20394	4,3689	3,30213	3,45771	2,5974
	SEM	3,271	1,86942	1,3765	1,50888	0,21998	0,42822	0,34317	0,59650
						8	1		9
Процент ID в базальных ганглиях (% ID)	Среднее значение	0,76751	0,62213	0,54969	0,51021	0,29792	0,26421	0,20304	0,22574
		9		3	8	8	3	3	2
	SEM	0,06860	0,08315	0,06296	0,05586	0,01988	0,00722	0,01189	0,01712
		8	7	4	8	9	1	2	6
Процент ID/г в базальных ганглиях (% ID/г)	Среднее значение	7,25586	5,88199	5,19664	4,82425	2,82807	2,46257	1,77921	1,8301
	SEM	0,67508	0,80469	0,61155	0,54622	0,22995	0,08579	0,11515	0,10420

Время (ч.)		0	0,25	0,5	0,75	6	24	168	336
			4	5		8	4	5	2
Процент ID в мозжечке (% ID)	Среднее значение	2,25101	2,49838	2,55948	2,42798	1,57106	1,66827	0,81414	0,82540
	SEM	1,04215	1,01889	0,90051	0,90006	0,37210	0,22930	0,28122	0,23981
				3		3	6	4	1
Процент ID/г в мозжечке (% ID/г)	Среднее значение	8,96768	9,93683	10,1651	9,64754	6,18103	6,58847	2,98996	2,83458
	SEM	4,22932	4,12692	3,65992	3,65352	1,44985	0,93847	1,02327	0,77790
							6		1
Процент ID в мозолистом теле (% ID)	Среднее значение	0,13909	0,13739	0,16520	0,14278	0,20167	0,20227	0,18161	0,16102
	SEM	0,06350	0,04064	0,03031	0,01841	0,00655	0,01508	0,01432	0,01204
		9	5	4	6	7	3	5	8
Процент ID/г в мозолистом теле (% ID/г)	Среднее значение	2,52116	2,49178	3,00274	2,59406	3,59332	3,60851	3,05074	2,50267
	SEM	1,15695	0,73900	0,55886	0,34100	0,06446	0,26008	0,1886	0,16224
			6	5	1	5	5		1
Процент ID в коре головного мозга (% ID)	Среднее значение	1,84462	1,96281	2,07334	2,01485	2,27264	2,15832	1,53834	1,35196
	SEM	0,68859	0,50514	0,44034	0,31156	0,06579	0,13806	0,17969	0,15936
		6	4	1	8	8	8	9	6
Процент ID/г в коре головного мозга (% ID/г)	Среднее значение	3,75097	3,99196	4,21446	4,09784	4,62061	4,35001	2,90653	2,37314
	SEM	1,39426	1,02969	0,89502	0,64719	0,11370	0,27219	0,30037	0,22228

Время (ч.)		0	0,25	0,5	0,75	6	24	168	336
				1	3	2	3	2	1
Процент ID в гиппокампе (% ID)	Среднее значение	1,67603	1,44975	1,3333	1,24861	0,75314	0,62177	0,65503	0,62261
	SEM	0,395049	0,320656	0,247148	0,243271	0,042542	0,093431	0,051347	0,069541
Процент ID/г в гиппокампе (% ID/г)	Среднее значение	13,3312	11,5318	10,6079	9,93388	6,04367	4,96917	4,88174	4,32414
	SEM	3,11226	2,52497	1,94088	1,91141	0,22641	0,739201	0,319607	0,503837
Процент ID в гипоталамусе (% ID)	Среднее значение	1,79208	1,26239	0,822021	0,791454	0,309715	0,211226	0,232952	0,209212
	SEM	0,018149	0,044894	0,084551	0,084724	0,038108	0,02012	0,019585	0,00656
Процент ID/г в гипоталамусе (% ID/г)	Среднее значение	31,8662	22,4567	14,6046	14,0554	5,4763	3,65892	3,80714	3,15945
	SEM	0,622153	0,985153	1,47659	1,45413	0,653269	0,367921	0,285807	0,194668
Процент ID в среднем мозге (% ID)	Среднее значение	8,43844	6,14699	4,92599	4,21695	1,50607	1,25278	1,06369	1,03389
	SEM	0,549632	0,264854	0,452126	0,348737	0,115545	0,117172	0,118459	0,088184
Процент ID/г в среднем мозге (% ID/г)	Среднее значение	29,2339	21,3004	17,0721	14,6209	5,22178	4,3333	3,41371	3,10658
	SEM	1,78711	0,839541	1,54884	1,22482	0,371463	0,409401	0,363526	0,234564

Время (ч.)		0	0,25	0,5	0,75	6	24	168	336
Процент ID в центрах обоняния (% ID)	Среднее значение	3,09383	2,72917	2,23702	1,91561	1,01767	0,868984	0,679099	0,624027
	SEM	0,423405	0,335251	0,27618	0,246519	0,119007	0,04595	0,047811	0,010891
Процент ID/г в центрах обоняния (% ID/г)	Среднее значение	38,9729	34,3305	28,1563	24,1244	12,8281	10,802	7,93742	6,82911
	SEM	5,78777	4,48914	3,75756	3,37889	1,61001	0,633288	0,584199	0,18264
Процент ID в других отделах (желудочках) (% ID)	Среднее значение	0,343633	0,279426	0,239164	0,209768	0,100025	0,08652	0,085407	0,085755
	SEM	0,059376	0,046773	0,034903	0,025436	0,005734	0,009182	0,004352	0,009717
Процент ID/г в других отделах (желудочков) (% ID/г)	Среднее значение	15,7006	12,7644	10,9255	9,58606	4,63014	3,97221	3,61689	3,41809
	SEM	2,70418	2,12314	1,58033	1,15794	0,165485	0,42827	0,121301	0,373455
Процент ID в септальной области (% ID)	Среднее значение	0,073996	0,058791	0,063152	0,050917	0,02835	0,026065	0,016707	0,018377
	SEM	0,045267	0,028474	0,016226	0,011536	0,002718	0,002504	0,001675	7,06E-05
Процент ID/г	Среднее значение	6,01601	4,78158	5,12945	4,13132	2,29807	2,04259	1,24867	1,33379

Время (ч.)		0	0,25	0,5	0,75	6	24	168	336
в септальной области (%) ID/г)	значени								
	SEM	3,70113	2,33093	1,33813	0,94940	0,27660	0,18285	0,15445	0,0225
					8	2	1	8	
Процент ID в таламусе (%) ID)	Среднее значени	0,35526	0,29337	0,26791	0,27112	0,16181	0,13642	0,19422	0,18901
	е	4	2	9	6		4	1	6
	SEM	0,10789	0,05870	0,03962	0,05780	0,01760	0,02789	0,00607	0,01142
		7	8	9	2	2	6	6	8
Процент ID/г в таламусе (%) ID/г)	Среднее значени	5,2993	4,37887	4,00206	4,04775	2,40781	2,02639	2,69809	2,39589
	е								
	SEM	1,59833	0,87122	0,59822	0,86155	0,22605	0,39453	0,07330	0,19287
			4	7	4	3	8	1	2
Процент ID в белом веществе (%) ID)	Среднее значени	1,29678	0,92497	0,71828	0,65116	0,25461	0,20178	0,18986	0,18323
	е		8	3	1	5	5	4	6
	SEM	0,07832	0,04563	0,01075	0,04475	0,01840	0,01956	0,00872	0,01779
		6	2	3	2	2	8	5	3
Процент ID/г в белом веществе (%) ID/г)	Среднее значени	24,0762	17,1758	13,3413	12,1025	4,75988	3,7307	3,28689	2,97632
	е								
	SEM	1,35368	0,78772	0,18021	0,87999	0,39094	0,33041	0,14563	0,27260
			4	2	1	2	4	4	4
Процент ID в целом головном мозге (% ID)	Среднее значени	22,6306	18,8312	16,329	14,815	8,66836	7,84457	6,01653	5,66245
	е								
	SEM	1,68624	1,35974	1,61868	1,73388	0,67315	0,35856	0,67017	0,59442
						2	4	1	1

Время (ч.)		0	0,25	0,5	0,75	6	24	168	336
Процент ID/г в целом головном мозге (ID/г)	Среднее значение	13,6667	11,3745	9,8642	8,95243	5,23969	4,71044	3,37774	2,9616
	SEM	1,05573	0,870626	1,01123	1,08442	0,4077	0,215852	0,355915	0,271713

Сравнительный GAPmer G

Время (ч.)		0	0,25	0,5	0,75	6	24	96	168	336
Процент ID в миндалевидном теле (ID)	Среднее значение	0,07025	0,157133	0,182216	0,204618	0,343688	0,239396	0,238917	0,269154	0,233677
	SEM	0,063589	0,103704	0,085755	0,077849	0,030438	0,005162	0,01289	0,008577	0,01741
Процент ID в миндалевидном теле (ID/г)	Среднее значение	1,59871	3,55317	4,09803	4,58765	7,5081	5,19617	5,055	5,67473	4,60241
	SEM	1,45175	2,37755	1,9771	1,79353	0,641745	0,156614	0,257744	0,207565	0,250856
Процент ID в базальных ганглиях (ID)	Среднее значение	0,117021	0,21681	0,265893	0,306322	0,381952	0,370599	0,337719	0,336959	0,313839
	SEM	0,076931	0,088946	0,044903	0,051348	0,066725	0,023366	0,027073	0,005895	0,040156
Процент ID в базальных ганглиях (ID/г)	Среднее значение	1,0588	1,96201	2,40278	2,76795	3,51276	3,33342	2,95949	2,87515	2,55187
	SEM	0,69611	0,80668	0,41412	0,47562	0,61178	0,19628	0,21828	0,03314	0,30845

Время (ч.)		0	0,25	0,5	0,75	6	24	96	168	336
		2	7	7	1	1	9	8	2	1
Процент ID в мозжечке (% ID)	Среднее значение	0,377037	1,0096	1,6223	1,9812	2,21016	2,45293	2,25788	1,87032	1,68511
	SEM	0,190099	0,127709	0,076476	0,217865	0,397162	0,248084	0,392909	0,16277	0,129536
Процент ID/г в мозжечке (% ID/г)	Среднее значение	1,43098	3,80814	6,10942	7,43788	8,66211	9,3077	8,35519	6,85223	5,74023
	SEM	0,73404	0,520186	0,338803	0,743845	1,65949	0,83535	1,37758	0,568067	0,397753
Процент ID в мозолистом теле (% ID)	Среднее значение	0,022238	0,055967	0,080598	0,09326	0,320271	0,284835	0,303873	0,289287	0,24998
	SEM	0,022224	0,041424	0,041437	0,037288	0,063501	0,024991	0,027853	0,028854	0,028791
Процент ID/г в мозолистом теле (% ID/г)	Среднее значение	0,39108	0,9794	1,40316	1,61839	5,59917	4,88872	5,14219	4,79623	3,87539
	SEM	0,390776	0,730546	0,730645	0,654849	1,08746	0,386997	0,447732	0,457439	0,399475
Процент ID в коре головного мозга (% ID)	Среднее значение	0,220028	0,633967	0,867894	1,11482	2,9228	2,62081	2,57875	2,38031	2,0868
	SEM	0,20834	0,32453	0,269076	0,261392	0,426537	0,262245	0,251051	0,250084	0,291286
Процент ID/г в коре головного мозга (% ID/г)	Среднее значение	0,436481	1,2498	1,70512	2,18607	5,78025	5,13609	4,93298	4,41018	3,66582
	SEM	0,41377	0,64825	0,53884	0,51940	0,80677	0,47136	0,42048	0,44161	0,46127

Время (ч.)		0	0,25	0,5	0,75	6	24	96	168	336
		5	4	2	4	8	9	7	7	1
Процент ID в гиппокампе (% ID)	Среднее значение	0,35119	0,74822	0,83660	1,01328	1,24774	0,97692	0,9861	1,09848	0,96287
	SEM	0,30877	0,41333	0,32756	0,32760	0,20125	0,04256	0,04953	0,08695	0,06174
		4	8		9	3	4	6	2	9
Процент ID/г в гиппокампе (% ID/г)	Среднее значение	2,75325	5,82967	6,49002	7,83626	9,76959	7,54148	7,41702	8,09684	6,64111
	SEM	2,43034	3,26845	2,58722	2,55293	1,5319	0,39292	0,41303	0,58851	0,32449
							5		6	5
Процент ID в гипоталамусе (% ID)	Среднее значение	0,31067	0,55603	0,63206	0,64722	0,46864	0,31675	0,29409	0,30726	0,27747
	SEM	0,19552	0,16708	0,08616	0,09615	0,07238	0,01554	0,02958	0,00855	0,05241
			7	8	6	8	5	9		4
Процент ID/г в гипоталамусе (% ID/г)	Среднее значение	5,45031	9,68302	10,9582	11,188	7,93032	5,33595	4,83903	4,86859	4,20649
	SEM	3,45552	2,98698	1,56155	1,64189	1,23903	0,31246	0,48839	0,06909	0,75383
							5	7	3	8
Процент ID в среднем мозге (% ID)	Среднее значение	4,33614	4,6489	4,70957	4,77253	2,81178	2,22989	2,22287	2,24199	2,04046
	SEM	1,09108	0,47243	0,55619	0,86033	0,31139	0,22745	0,23922	0,19601	0,16772
			4	8	5	5	9	3	3	3
Процент ID/г в среднем мозге (% ID/г)	Среднее значение	14,6252	15,6356	15,8197	16,0115	9,51511	7,46745	7,27228	7,12792	6,11257
	SEM	3,79365	1,65574	1,83494	2,81171	0,98630	0,73365	0,69329	0,56799	0,44417
						6	8	8	9	7

Время (ч.)		0	0,25	0,5	0,75	6	24	96	168	336
Процент ID в центрах обоняния (% ID)	Среднее	0,14996	0,63252	1,03599	1,26658	1,24326	1,13771	0,95842	0,90053	0,82147
	значения	2	5					5	6	3
	SEM	0,14563	0,32823	0,24765	0,24103	0,12307	0,08978	0,12822	0,06418	0,06716
		8		1	7	4	9	4	4	5
Процент ID/г в центрах обоняния (% ID/г)	Среднее	1,87276	7,74847	12,5673	15,3101	15,3729	13,899	11,474	10,5042	9,0143
	значения									
	SEM	1,82129	4,07012	2,99221	2,78286	1,67593	0,85992	1,24418	0,55922	0,56769
							7		5	6
Процент ID в других отделах (желудочках) (% ID)	Среднее	0,10370	0,18543	0,19447	0,21711	0,19790	0,15170	0,14973	0,17169	0,15124
	значения	3	2	3	7	3	1	9	3	4
	SEM	0,06470	0,05347	0,04222	0,04851	0,03170	0,01202	0,01380	0,02014	0,01396
		1	3	9	8	4	8	4	5	9
Процент ID/г в других отделах (желудочков) (% ID/г)	Среднее	4,78859	8,43852	8,78707	9,76454	8,6628	6,77372	6,44925	7,21803	5,96959
	значения									
	SEM	3,07256	2,59532	1,96278	2,10578	1,32337	0,53985	0,49445	0,80769	0,44098
							5	6	7	
Процент ID в септальной области (% ID)	Среднее	0,00153	0,00660	0,01593	0,01839	0,03983	0,03545	0,03064	0,03209	0,02905
	значения	9	6	2	6	3	4	7	3	1
	SEM	0,00153	0,00358	8,82E-05	0,00393	0,01193	0,00371	0,00907	0,00169	0,00586
		9	3		2		5	7	3	4
Процент ID/г	Среднее	0,12080	0,52700	1,27118	1,46742	3,10952	2,7415	2,29345	2,38383	1,99012

Время (ч.)		0	0,25	0,5	0,75	6	24	96	168	336
в септальной области (% ID/г)	значени	1	8							
	SEM	0,120767	0,282368	0,015955	0,309541	0,891273	0,298319	0,674918	0,108081	0,356811
Процент ID в таламусе (% ID)	Среднее значение	0,092871	0,150887	0,196566	0,219307	0,330367	0,230327	0,239492	0,267022	0,259107
	SEM	0,087919	0,095029	0,106559	0,089875	0,103733	0,028211	0,016836	0,038453	0,035847
Процент ID/г в таламусе (% ID/г)	Среднее значение	1,35285	2,1754	2,82156	3,12705	4,75564	3,29927	3,32141	3,61865	3,31424
	SEM	1,28417	1,39631	1,56503	1,3048	1,432	0,397001	0,246257	0,503694	0,400364
Процент ID в белом веществе (% ID)	Среднее значение	0,488571	0,647725	0,639413	0,682258	0,413888	0,344319	0,331351	0,343591	0,309396
	SEM	0,165272	0,08416	0,056944	0,104846	0,047088	0,032138	0,028182	0,022572	0,029752
Процент ID/г в белом веществе (% ID/г)	Среднее значение	8,95911	11,7844	11,5942	12,3289	7,60563	6,27336	5,76995	5,89313	4,99564
	SEM	3,18773	1,61296	0,885738	1,64353	0,721249	0,575411	0,454626	0,362268	0,449234
Процент ID в целом головном мозге (% ID)	Среднее значение	6,64123	9,64981	11,2795	12,5369	12,9323	11,3917	10,9299	10,5087	9,42048
	SEM	2,56605	2,14697	1,5151	1,90975	1,21462	0,926368	1,03752	0,787061	0,878424

Время (ч.)		0	0,25	0,5	0,75	6	24	96	168	336
Процент ID/г в целом в головном мозге (ID/г)	Среднее значение	3,88961	5,63422	6,57098	7,29032	7,62932	6,62764	6,20152	5,81735	4,91559
	SEM	1,53724	1,29676	0,90146	1,07932	0,68357	0,49343	0,51978	0,38773	0,39317
				5		5	8	5		8

Оценка GAPmer для тау-белка в полученных из iPSC человека нейронах

[0324] Затем сравнивали эффективность одного из главных GAPmer (GAPmer E) с эффективностью GAPmer Ionis для тау-белка (GAPmer G) в уменьшении уровня mRNA тау-белка в полученных из iPSC человека нейронах (iNeurons). iNeurons обрабатывали различными дозами обоих GAPmer в течение в общей сложности 72 часов и собирали общую клеточную РНК. mRNA тау-белка измеряли с помощью 6 разных анализов, а также с помощью специфичных в отношении тау-белка с 3R и 4R анализов (таблица 16). Оба соединения дозозависимым образом снижали уровни mRNA тау-белка. Однако GAPmer E неизменно показывал в ~4-5 раз меньшие значения IC_{50} , что указывает на то, что GAPmer более эффективный, чем GAPmer G.

Таблица 16

Анализ JPNV-1 на общее содержание mRNA тау-белка						
	GAPmer G			GAPmer E		
Логарифм дозы (мМ)	Средн.	SEM	N	Средн.	SEM	N
-4,41	100,00	5,26	2,00	100,00	8,90	2,00
-4,11	105,73	7,76	2,00	66,20	7,97	2,00
-3,81	76,81	3,49	2,00	57,05	0,89	2,00
-3,51	59,15	5,15	2,00	53,71	4,27	2,00
-3,20	73,86	3,19	2,00	56,45	3,76	2,00
-2,90	75,20	1,16	2,00	52,56	2,43	2,00
-2,60	60,12	3,61	2,00	42,05	2,25	2,00
-2,30	51,36	4,79	2,00	39,61	3,82	2,00
-2,00	43,01	2,99	2,00	30,64	1,39	2,00
-1,70	43,88	1,82	2,00	33,58	1,55	2,00
Анализ JPNV-2 на общее содержание mRNA тау-белка						
	GAPmer G			GAPmer E		
Логарифм дозы (мМ)	Средн.	SEM	N	Средн.	SEM	N

-4,41	100,00	6,41	2,00	100,00	6,21	2,00
-4,11	24,84	1,80	2,00	20,00	1,19	2,00
-3,81	56,59	2,16	2,00	48,73	4,79	2,00
-3,51	51,51	3,69	2,00	35,98	1,63	2,00
-3,20	51,49	1,82	2,00	36,62	2,60	2,00
-2,90	53,65	1,19	2,00	37,02	0,96	2,00
-2,60	40,99	2,12	2,00	29,15	1,35	2,00
-2,30	39,59	1,79	2,00	29,71	2,44	2,00
-2,00	34,02	1,03	2,00	25,37	1,82	2,00
-1,70	29,58	2,78	2,00	24,24	0,94	2,00
Анализ mRNA тау-белка с 3R						
	GAPmer G			GAPmer E		
Логарифм дозы (мМ)	Средн.	SEM	N	Средн.	SEM	N
-4,41	100,00	5,06	2,00	100,00	6,68	2,00
-4,11	98,52	6,40	2,00	70,06	4,91	2,00
-3,81	67,36	2,95	2,00	51,92	1,81	2,00
-3,51	73,28	5,54	2,00	46,44	2,02	2,00
-3,20	78,75	7,03	2,00	54,94	4,38	2,00
-2,90	72,16	3,92	2,00	49,60	1,83	2,00
-2,60	55,58	6,73	2,00	36,87	3,68	2,00
-2,30	55,57	2,90	2,00	38,88	1,99	2,00
-2,00	46,08	3,19	2,00	31,61	3,47	2,00
-1,70	46,00	2,33	2,00	28,60	1,53	2,00
Анализ mRNA тау-белка с 4R						
	GAPmer G			GAPmer E		
Логарифм дозы (мМ)	Средн.	SEM	N	Средн.	SEM	N
-4,41	100,00	8,07	2,00	100,00	8,66	2,00
-4,11	98,95	10,45	2,00	68,72	10,10	2,00
-3,81	71,44	7,35	2,00	66,14	9,41	2,00
-3,51	86,77	10,41	2,00	45,76	5,40	2,00
-3,20	89,66	4,77	2,00	59,82	4,93	2,00
-2,90	75,93	5,07	2,00	51,76	4,18	2,00

-2,60	74,03	5,98	2,00	44,10	5,51	2,00
-2,30	62,73	4,05	2,00	43,65	5,14	2,00
-2,00	60,46	5,68	2,00	38,37	4,26	2,00
-1,70	61,52	5,36	2,00	28,82	1,55	2,00
Анализ B01 на общее содержание mRNA тау-белка						
	GAPmer G			GAPmer E		
Логарифм дозы (мМ)	Средн.	SEM	N	Средн.	SEM	N
-4,41	100,00	4,14	2,00	100,00	5,90	2,00
-4,11	111,85	13,42	2,00	67,28	2,70	2,00
-3,81	58,26	1,91	2,00	45,92	1,66	2,00
-3,51	57,40	5,01	2,00	39,63	3,68	2,00
-3,20	51,69	1,20	2,00	37,51	1,63	2,00
-2,90	49,11	3,05	2,00	35,71	3,17	2,00
-2,60	43,08	2,04	2,00	29,67	1,24	2,00
-2,30	36,56	3,01	2,00	27,05	1,49	2,00
-2,00	33,47	1,85	2,00	25,92	1,70	2,00
-1,70	31,96	1,35	2,00	23,63	1,12	2,00
Анализ B02 на общее содержание mRNA тау-белка						
	GAPmer G			GAPmer E		
Логарифм дозы (мМ)	Средн.	SEM	N	Средн.	SEM	N
-4,41	100,00	18,06	2,00	100,00	16,10	2,00
-4,11	89,43	13,92	2,00	86,50	6,39	2,00
-3,81	76,62	4,87	2,00	73,14	3,78	2,00
-3,51	76,28	5,80	2,00	70,26	5,44	2,00
-3,20	57,42	22,00	2,00	62,15	22,69	2,00
-2,90	56,07	17,26	2,00	66,44	25,75	2,00
-2,60	56,68	5,62	2,00	50,53	6,40	2,00
-2,30	56,02	5,75	2,00	54,94	3,18	2,00
-2,00	58,70	4,16	2,00	48,44	2,30	2,00
-1,70	60,05	4,55	2,00	50,47	2,71	2,00
Анализ B04 на общее содержание mRNA тау-белка						
	GAPmer G			GAPmer E		

Логарифм дозы (мМ)	Средн.	SEM	N	Средн.	SEM	N
-4,41	100,00	6,21	2,00	100,00	9,22	2,00
-4,11	99,83	7,72	2,00	71,27	4,72	2,00
-3,81	91,52	9,34	2,00	59,20	3,96	2,00
-3,51	91,28	6,40	2,00	62,05	3,23	2,00
-3,20	96,69	3,34	2,00	65,94	4,10	2,00
-2,90	88,52	4,15	2,00	57,63	4,19	2,00
-2,60	73,91	6,53	2,00	47,11	1,37	2,00
-2,30	72,26	3,42	2,00	46,09	3,69	2,00
-2,00	71,32	2,46	2,00	43,76	2,19	2,00
-1,70	74,91	5,87	2,00	42,52	3,95	2,00
Анализ B06 на общее содержание mRNA тау-белка						
	GAPmer G			GAPmer E		
Логарифм дозы (мМ)	Средн.	SEM	N	Средн.	SEM	N
-4,41	100,00	105,59	2,00	100,00	110,27	2,00
-4,11	124,26	111,64	2,00	51,19	72,99	2,00
-3,81	150,32	81,10	2,00	42,93	62,90	2,00
-3,51	103,10	62,46	2,00	34,99	59,23	2,00
-3,20	53,75	77,99	2,00	44,52	62,24	2,00
-2,90	66,83	79,40	2,00	45,46	57,96	2,00
-2,60	105,07	63,48	2,00	14,83	46,37	2,00
-2,30	55,09	54,23	2,00	39,97	43,68	2,00
-2,00	39,68	45,41	2,00	23,71	33,79	2,00
-1,70	94,51	46,33	2,00	42,82	37,02	2,00

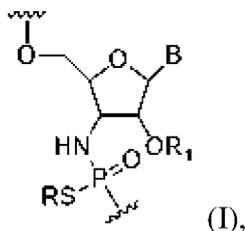
Способ лечения

[0325] Взрослому человеку, страдающему таупатией, такой как болезнь Альцгеймера (AD), вводят посредством любого подходящего пути введения, такого как интратекальный или интрацеребровентрикулярный пути введения, терапевтически эффективное соединение в виде олигонуклеотида по настоящему изобретению, например олигонуклеотида, имеющего последовательность нуклеиновых оснований, соответствующую SEQ ID NO: 1, и модифицированный в соответствии с настоящим изобретением. Подходящие пути введения могут включать системное введение, такое как внутривенный или подкожный пути введения, или введение непосредственно в ЦНС посредством интратекального или интрацеребровентрикулярного путей введения. Лечение продолжают до облегчения одного или более симптомов таупатии, такой как AD,

или, например, до снижения уровней тау-белка.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Олигонуклеотид, комплементарный по меньшей мере части гена МАРТ, содержащий один или более нуклеотидов формулы (I),



где

R представляет собой H или положительно заряженный противоион,

B представляет собой нуклеиновое основание,

R₁ представляет собой -(CR'₂)₂OCR'₃, и

R' независимо в каждом случае представляет собой H или F.

2. Олигонуклеотид по п. 1, где каждый нуклеотид указанного олигонуклеотида представляет собой нуклеотид формулы (I).

3. Олигонуклеотид по п. 1, где олигонуклеотид содержит от 2 до 40 нуклеотидов.

4. Олигонуклеотид по п. 1, где олигонуклеотид содержит 2-26 нуклеотидов формулы (I).

5. Олигонуклеотид по п. 1, где олигонуклеотид содержит 5-10 нуклеотидов формулы (I).

6. Олигонуклеотид по п. 1, где B представляет собой немодифицированное нуклеиновое основание в по меньшей мере одном нуклеотиде формулы (I).

7. Олигонуклеотид по п. 1, где B представляет собой модифицированное нуклеиновое основание в по меньшей мере одном нуклеотиде формулы (I).

8. Олигонуклеотид по п. 1, где B представляет собой немодифицированное нуклеиновое основание в каждом нуклеотиде формулы (I).

9. Олигонуклеотид по п. 1, где B представляет собой модифицированное нуклеиновое основание в каждом нуклеотиде формулы (I).

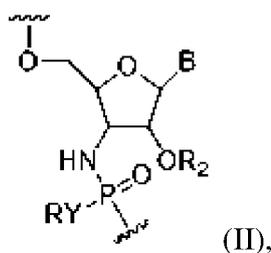
10. Олигонуклеотид по п. 1, где каждый R' представляет собой H в по меньшей мере одном нуклеотиде формулы (I).

11. Олигонуклеотид по п. 1, где каждый R' представляет собой H в каждом нуклеотиде формулы (I).

12. Олигонуклеотид по п. 1, где R₁ представляет собой -(CH₂)₂OCH₃ в по меньшей мере одном нуклеотиде формулы (I).

13. Олигонуклеотид по п. 1, где R₁ представляет собой -(CH₂)₂OCH₃ в каждом нуклеотиде формулы (I).

14. Олигонуклеотид по любому из пп. 1-13, где олигонуклеотид дополнительно содержит один или более нуклеотидов формулы (II),



где

Y представляет собой S или O,

R представляет собой H или положительно заряженный противоион,

B представляет собой нуклеиновое основание,

R₂ представляет собой -CR'₃, -CR'₂OCR'₃, -(CR'₂)₃OCR'₃ или -(CR'₂)₁₋₂CR'₃, или R₂ представляет собой -(CR'₂)₂OCR'₃, и Y представляет собой O, и

R' независимо в каждом случае представляет собой H или F.

15. Олигонуклеотид по п. 14, где олигонуклеотид содержит по меньшей мере один нуклеотид формулы (II), где R₂ представляет собой -CR'₃.

16. Олигонуклеотид по п. 14, где олигонуклеотид содержит по меньшей мере один нуклеотид формулы (II), где R₂ представляет собой -(CR'₂)₁₋₂OCR'₃.

17. Олигонуклеотид по п. 14, где олигонуклеотид содержит по меньшей мере один нуклеотид формулы (II), где R₂ представляет собой -(CR'₂)₁₋₂CR'₃.

18. Олигонуклеотид по п. 14, где B представляет собой модифицированное нуклеиновое основание в по меньшей мере одном нуклеотиде формулы (II).

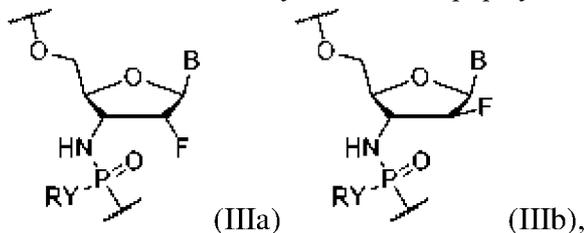
19. Олигонуклеотид по п. 14, где Y представляет собой S в по меньшей мере одном нуклеотиде формулы (II).

20. Олигонуклеотид по п. 14, где Y представляет собой O в по меньшей мере одном нуклеотиде формулы (II).

21. Олигонуклеотид по п. 14, где Y представляет собой S в каждом нуклеотиде формулы (II).

22. Олигонуклеотид по п. 14, где Y представляет собой O в каждом нуклеотиде формулы (II).

23. Олигонуклеотид по любому из пп. 1-22, где олигонуклеотид дополнительно содержит один или более нуклеотидов формулы (IIIa) или формулы (IIIb),



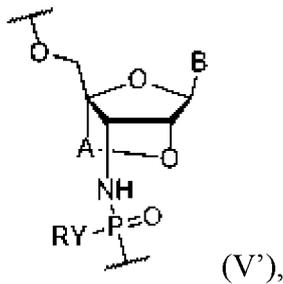
где

Y представляет собой S или O,

R представляет собой H или положительно заряженный противоион, и

B представляет собой нуклеиновое основание.

24. Олигонуклеотид по любому из пп. 1-23, где олигонуклеотид дополнительно содержит один или более нуклеотидов формулы (V'),



где

Y представляет собой S или O,

R представляет собой H или положительно заряженный противоион,

B независимо в каждом случае представляет собой природное или немодифицированное нуклеиновое основание или модифицированное нуклеиновое основание,

A представляет собой $-(CR''R'')_{1-2}$, и

R'' независимо в каждом случае представляет собой H, F или Me.

25. Олигонуклеотид по любому из пп. 1-24, где олигонуклеотид расположен в конструкции формулы (VI),

5' X-Y-Z 3' (VI),

где

каждый из X, Y и Z представляет собой домен, содержащий 2-10 нуклеотидов, по меньшей мере один из доменов X и Z содержит по меньшей мере один нуклеотид формулы (I), и где каждый из нуклеотидов домена Y представляет собой 2'-дезоксинуклеотид.

26. Олигонуклеотид по п. 24, где олигонуклеотид содержит от 18 до 22 нуклеотидов.

27. Олигонуклеотид по п. 24, где каждый из доменов X и Z содержит 5-10 нуклеотидов.

28. Олигонуклеотид по п. 24, где домен Y содержит 5-10 нуклеотидов.

29. Олигонуклеотид по п. 24, где каждый из доменов X и Z содержит 5-10 нуклеотидов, и домен Y содержит 5-10 нуклеотидов.

30. Олигонуклеотид по п. 24, где каждый из доменов X и Z содержит 5 нуклеотидов, и домен Y содержит 10 нуклеотидов.

31. Олигонуклеотид по п. 24, где каждый нуклеотид доменов X и Z представляет собой нуклеотид формулы (I).

32. Олигонуклеотид по п. 24, где каждый из по меньшей мере одного нуклеотида домена X и по меньшей мере одного нуклеотида домена Z независимо выбран из группы, состоящей из нуклеотида формулы (II), нуклеотида формулы (IIIa) и нуклеотида формулы (IIIb).

33. Олигонуклеотид по п. 32, где каждый из по меньшей мере одного нуклеотида

доменов X и Z является одним и тем же нуклеотидом.

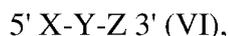
34. Олигонуклеотид по п. 24, где каждый нуклеотид домена Y связан посредством тиофосфатных межсубъединичных связей.

35. Олигонуклеотид по любому из пп. 1-34, где олигонуклеотид является однонитевым.

36. Олигонуклеотид по п. 35, где олигонуклеотид представляет собой антисмысловой олигонуклеотид.

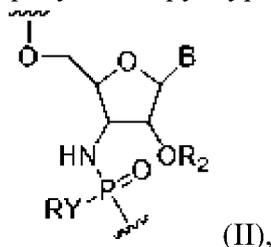
37. Олигонуклеотид по любому из пп. 1-36, где последовательность нуклеиновых оснований олигонуклеотида соответствует SEQ ID NO: 1.

38. Олигонуклеотид по п. 37, где олигонуклеотид расположен в конструкции формулы (VI),



где

каждый из доменов X и Z содержит 5 нуклеотидов, где каждый нуклеотид характеризуется структурой формулы (II),



где

Y представляет собой S,

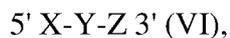
R представляет собой H,

B представляет собой нуклеиновое основание,

R₂ представляет собой (CR'₂)₂OCR'₃, где каждый R' представляет собой H; и

домен Y содержит 10 нуклеотидов, каждый из которых связан посредством фосфотиоатных связей, и каждый из которых представляет собой 2'-дезоксинуклеотид.

39. Химерный олигонуклеотид, комплементарный по меньшей мере части гена MART, представленный формулой (VI),



где

X-Y-Z представляет собой химерный олигонуклеотид, содержащий последовательность из 18-22 нуклеозидов и необязательно конъюгированный по 5'- и/или 3'-концу с лиганд-нацеленной группой;

X представляет собой домен, содержащий последовательность модифицированных нуклеозидов, длина которой составляет 3-10 нуклеозидов;

Z представляет собой домен, содержащий последовательность модифицированных нуклеозидов, длина которой составляет 3-10 нуклеозидов; и

Y представляет собой домен, содержащий последовательность из 2-10 2'-

дезоксинуклеозидов, связанных посредством тиофосфатных межсубъединичных связей.

40. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где длина домена Y составляет 6-10 нуклеозидов.

41. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где домены X и/или Z содержат последовательность модифицированных нуклеозидов, связанных посредством фосфорамидатных $N3' \rightarrow P5'$ или тиофосфорамидатных $N3' \rightarrow P5'$ межсубъединичных связей.

42. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где домен Y содержит по меньшей мере одну фосфодиэфирную межсубъединичную связь.

43. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где домен Y состоит из 2'-дезоксинуклеозидов, связанных посредством тиофосфатных межсубъединичных связей и необязательно одной или двух фосфодиэфирных межсубъединичных связей.

44. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где домен X содержит модифицированные нуклеозиды, где модификация независимо выбрана из группы, состоящей из 2'-F, 2'-F- $N3' \rightarrow P5'$, 2'-OMe, 2'-OMe- $N3' \rightarrow P5'$, 2'-O-метоксиэтокси, 2'-O-метоксиэтокси- $N3' \rightarrow P5'$, конформационно ограниченных нуклеозидов, тиофосфорамидата 2'-ОН- $N3' \rightarrow P5'$ и фосфорамидата 2'-ОН- $N3' \rightarrow P5'$.

45. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где функциональный домен Z содержит модифицированные нуклеозиды, где модификация выбрана из группы, состоящей из 2'-F, 2'-F- $N3' \rightarrow P5'$, 2'-OMe, 2'-OMe- $N3' \rightarrow P5'$, 2'-O-метоксиэтокси, 2'-O-метоксиэтокси- $N3' \rightarrow P5'$, конформационно ограниченных нуклеозидов, тиофосфорамидата 2'-ОН- $N3' \rightarrow P5'$ и фосфорамидата 2'-ОН- $N3' \rightarrow P5'$.

46. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где домены X и/или Z содержат один или более 2'-дезоксинуклеозидов, связанных посредством фосфорамидатной межсубъединичной связи $N3' \rightarrow P5'$.

47. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где домены X и Z содержат один или более 2'-арабино-F и/или 2'-рибо-F-модифицированных нуклеозидов, где каждый указанный нуклеозид независимо связан посредством по меньшей мере одной из фосфорамидатной $N3' \rightarrow P5'$ или тиофосфорамидатной $N3' \rightarrow P5'$ межсубъединичной связи.

48. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где домены X и Z содержат один или более 2'-OMe-модифицированных нуклеозидов, где каждый указанный нуклеозид независимо связан посредством по меньшей мере одной из фосфорамидатной $N3' \rightarrow P5'$, тиофосфорамидатной $N3' \rightarrow P5'$ или тиофосфатной межсубъединичных связей.

49. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где модифицированные нуклеозиды в каждом из доменов X и Z представляют собой 2'-OMe-модифицированные нуклеозиды, связанные посредством тиофосфатных межсубъединичных связей, и где модифицированные нуклеозиды включают 5-метилцитозиновые нуклеиновые основания, но необязательно не являющиеся цитозином.

50. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где модифицированные нуклеозиды включают 2,6-диаминопуриновые нуклеиновые основания, но необязательно не

являющиеся аденином.

51. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где модифицированные нуклеозиды включают 5-метилурациловые нуклеиновые основания, но необязательно не являющиеся урацилом.

52. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где модифицированные нуклеозиды включают 2,6-диаминопуриновые нуклеиновые основания, но не являющиеся аденином и 5-метилурациловые нуклеиновые основания, но необязательно не являющиеся урацилом.

53. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где домен Y содержит 6-8 2'-дезоксинуклеозидов.

54. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где модифицированные нуклеозиды в каждом из доменов X и Z содержат 2'-ОМе-модифицированные нуклеозиды и конформационно ограниченные нуклеозиды, необязательно связанные посредством тиофосфатных межсубъединичных связей, и где 2'-ОМе-модифицированные нуклеозиды включают 5-метилцитозиновые нуклеиновые основания, но необязательно не являющиеся цитозином.

55. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где модифицированные нуклеозиды в каждом из доменов X и Z предусматривают 2'-ОМе- и конформационно ограниченные нуклеозиды.

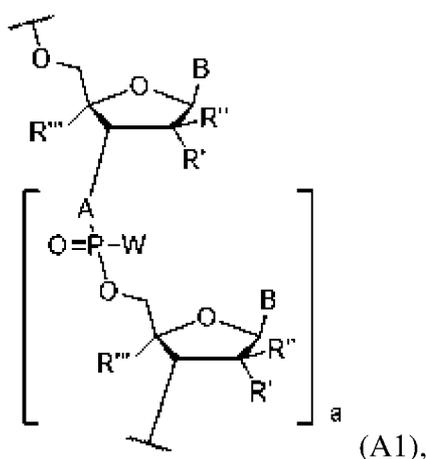
56. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где модифицированные нуклеозиды в каждом из доменов X и Z предусматривают конформационно ограниченные нуклеозиды, и при этом по меньшей мере один модифицированный нуклеозид включает фосфорамидатную $N3' \rightarrow P5'$ или тиофосфорамидатную $N3' \rightarrow P5'$ межсубъединичную связь.

57. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где домен Y содержит 7-8 2'-дезоксинуклеозидов.

58. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где 2'-ОМе-модифицированные нуклеозиды включают 5-метилурациловые нуклеиновые основания, но необязательно не являющиеся урацилом.

59. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где домен Y содержит 9-10 2'-дезоксинуклеозидов.

60. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где домены X и Z содержат нуклеотиды, представленные формулой (A1),



где

A независимо в каждом случае представляет собой NH или O;

B независимо в каждом случае представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание;

W независимо в каждом случае представляет собой OR или SR, где R представляет собой H или положительно заряженный противоион;

каждый из R' и R'' независимо в каждом случае выбран из группы, состоящей из H, F, Cl, OH, OMe, Me и O-метоксиэтокс;

R''' представляет собой H, или R' и R''' вместе образуют -O-CH₂- или -O-(CH₂)₂-, и a представляет собой целое число от 3 до 9,

где в случае если каждый из R', R'' и R''' представляет собой H, то A представляет собой NH, и необязательно в случае если A представляет собой O, то W представляет собой SR.

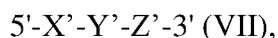
61. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где домен X и/или Z содержит один или более олигонуклеотидов, где модификация представляет собой 2'-O-метоксиэтокс-N3'→P5'.

62. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где домен X содержит один или более олигонуклеотидов, где модификация представляет собой 2'-O-метоксиэтокс-N3'→P5'.

63. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где домен Z содержит один или более олигонуклеотидов, где модификация представляет собой 2'-O-метоксиэтокс-N3'→P5'.

64. Химерный олигонуклеотид по п. 39, где последовательность нуклеиновых оснований олигонуклеотида соответствует SEQ ID NO: 1.

65. Химерный олигонуклеотид, имеющий последовательность, комплементарную по меньшей мере части последовательности гена MАРТ, где указанный олигонуклеотид содержит конструкцию, представленную формулой (VII),



где

X'-Y'-Z' представляет собой химерный олигонуклеотид, содержащий последовательность из 16-22 нуклеозидов и необязательно конъюгированный по 5'- и/или 3'-концу;

X' представляет собой домен, содержащий последовательность модифицированных нуклеозидов, длина которой составляет 3-10 нуклеозидов;

Z' представляет собой домен, содержащий последовательность модифицированных нуклеозидов, длина которой составляет 3-10 нуклеозидов; и

Y' представляет собой домен, содержащий последовательность из 2-4 2'-дезоксинуклеозидов, связанных посредством межсубъединичных связей,

где домены X' и/или Z' содержат последовательность модифицированных нуклеозидов, связанных посредством фосфорамидатных N3'→P5' или тиофосфорамидатных N3'→P5' межсубъединичных связей.

66. Химерный олигонуклеотид по п. 65, где домен Y' состоит из 2'-дезоксинуклеозидов, связанных посредством тиофосфатных межсубъединичных связей и необязательно одной фосфодиэфирной межсубъединичной связи.

67. Химерный олигонуклеотид по п. 65, где длина домена X' составляет 9 или 10 нуклеозидов.

68. Химерный олигонуклеотид по п. 65, где домен X' содержит модифицированные нуклеозиды, где модификация выбрана из группы, состоящей из 2'-F, 2'-F-N3'→P5', 2'-OMe, 2'-OMe-N3'→P5', 2'-O-метоксиэтокси, 2'-O-метоксиэтокси-N3'→P5' и конформационно ограниченных нуклеозидов.

69. Химерный олигонуклеотид по п. 65, где домен Z' содержит модифицированные нуклеозиды, где модификация выбрана из группы, состоящей из 2'-F, 2'-F-N3'→P5', 2'-ОН, 2'-OMe, 2'-OMe-N3'→P5', 2'-O-метоксиэтокси, 2'-O-метоксиэтокси-N3'→P5' и конформационно ограниченных нуклеозидов.

70. Химерный олигонуклеотид по п. 65, где домены X' и/или Z' содержат один или более 2'-арабино-F и/или 2'-рибо-F-модифицированных нуклеозидов.

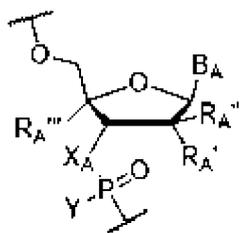
71. Химерный олигонуклеотид по п. 65, где модифицированные нуклеозиды в доменах X' и/или Z' предусматривают 2'-OMe- и конформационно ограниченные нуклеозиды.

72. Химерный олигонуклеотид по п. 65, где модифицированные нуклеозиды в доменах X' и/или Z' предусматривают конформационно ограниченные нуклеозиды и модификацию N3'→P5'.

73. Химерный олигонуклеотид по п. 65, где последовательность выбрана из последовательностей в таблице В, имеющих домен Y' из 2-4 нуклеотидов.

74. Химерный олигонуклеотид по п. 65, где последовательность нуклеиновых оснований олигонуклеотида соответствует SEQ ID NO: 1.

75. Олигонуклеотид, имеющий последовательность, комплементарную по меньшей мере части последовательности гена MАРТ, при этом указанный олигонуклеотид содержит один или более нуклеотидов следующей формулы (А),



(VIII),

где

X_A представляет собой NH или O,

Y представляет собой OR или SR, где R представляет собой H или положительно заряженный противоион;

B_A независимо в каждом случае представляет собой природное или немодифицированное нуклеиновое основание или модифицированное нуклеиновое основание,

каждый из R_A' и R_A'' независимо в каждом случае выбран из H, F, OH, OMe, Me, O-метоксиэтокси, и

R_A''' представляет собой H, или R_A' и R_A''' вместе образуют $-O-CH_2-$ или $-O-(CH_2)_2-$.

76. Олигонуклеотид по п. 75, где R_A' и R_A''' представляют собой H; и R_A'' представляет собой F.

77. Олигонуклеотид по п. 75, где R_A' и R_A'' представляют собой H; и R_A''' представляет собой F, OH, H или OMe.

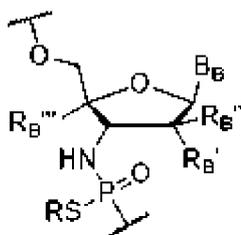
78. Олигонуклеотид по п. 75, где X_A представляет собой NH; B_A представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание; R_A' и R_A''' вместе образуют конформационно ограниченный нуклеозид (например, $-O-CH_2-$ или $-O-(CH_2)_2-$); и R_A'' представляет собой H.

79. Олигонуклеотид по п. 75, где по меньшей мере один из R_A' и R_A'' представляет собой H.

80. Олигонуклеотид по п. 75, где в случае если B_A представляет собой пуриновое нуклеиновое основание, по меньшей мере один из R_A' и R_A'' представляет собой OH или F, и/или в случае если B_A представляет собой пиримидиновое нуклеиновое основание, по меньшей мере один из R_A' и R_A'' представляет собой OMe, OH или F.

81. Олигонуклеотид по п. 75, где модифицированное нуклеиновое основание выбрано из 5-метилцитозина, 2,6-диаминопурина, 5-метилурацила и g-фиксирующего основания.

82. Олигонуклеотид, имеющий последовательность, комплементарную последовательности гена МАРТ, при этом указанный олигонуклеотид содержит десять или больше нуклеотидов следующей формулы (IX),



(IX),

где

R представляет собой H или положительно заряженный противоион,

B_B независимо в каждом случае представляет собой природное или немодифицированное нуклеиновое основание или модифицированное нуклеиновое основание,

каждый из R_B' и R_B'' независимо в каждом случае выбран из H, F, OMe, Me, O-метоксиэтокси, и

R_B''' представляет собой H, или R_B' и R_B''' вместе образуют -O-CH₂- или -O-(CH₂)₂-.

83. Олигонуклеотид по п. 82, где R_B' и R_B''' представляют собой H; и R_B'' представляет собой F.

84. Олигонуклеотид по п. 82, где R_B' и R_B'' представляют собой H; и R_B''' представляет собой F, OH, H или OMe.

85. Олигонуклеотид по п. 82, где B_B представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание; R_B' и R_B''' вместе образуют конформационно ограниченный нуклеозид (например, -O-CH₂- или -O-(CH₂)₂-); и R_B'' представляет собой H.

86. Олигонуклеотид по п. 82, где по меньшей мере один из R_B' и R_B'' представляет собой H.

87. Олигонуклеотид по п. 82, где в случае если B_B представляет собой пуриновое нуклеиновое основание, по меньшей мере один из R_B' и R_B'' представляет собой OH или F, и/или в случае если B_B представляет собой пиримидиновое нуклеиновое основание, по меньшей мере один из R_B' и R_B'' представляет собой OMe, OH или F.

88. Олигонуклеотид по п. 82, где модифицированное нуклеиновое основание выбрано из 5-метилцитозина, 2,6-диаминопурина, 5-метилурацила и g-фиксирующего основания.

89. Фармацевтическая композиция, содержащая олигонуклеотид по любому из пп. 1-88 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

90. Фармацевтическая композиция по п. 89, где композиция является подходящей для интратекальной или интрацеребровентрикулярной доставки.

91. Способ подавления экспрессии гена MАРТ в клетке ЦНС, предусматривающий приведение клетки в контакт с олигонуклеотидом или композицией по любому из пп. 1-90.

92. Способ подавления транскрипции mRNA MАРТ в клетке ЦНС,

предусматривающий приведение клетки в контакт с олигонуклеотидом или композицией по любому из пп. 1-90.

93. Способ лечения субъекта, у которого имеется таупатия, предусматривающий введение субъекту терапевтически эффективного количества олигонуклеотида или композиции по любому из пп. 1-90.

94. Способ по п. 93, где таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера.

95. Олигонуклеотид по любому из пп. 1-94, где указанный олигонуклеотид образует комплекс с геном MAPT, характеризующийся температурой плавления (T_m), составляющей $> 37^\circ\text{C}$.

96. Способ лечения субъекта, у которого имеется таупатия, предусматривающий введение субъекту терапевтически эффективного количества олигонуклеотида или композиции по любому из пп. 1-90.

97. Способ по п. 96, где таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера.

98. Способ подавления экспрессии mRNA MAPT в клетке ЦНС, предусматривающий приведение клетки в контакт с олигонуклеотидом или композицией, содержащей олигонуклеотид по любому из пп. 1-90, где олигонуклеотид содержит последовательность нуклеиновых оснований, которая комплементарна по меньшей мере части mRNA MAPT или гибридизируется с ней.

99. Способ лечения субъекта, у которого имеется таупатия, предусматривающий введение субъекту терапевтически эффективного количества олигонуклеотида или композиции, содержащей указанный олигонуклеотид по любому из пп. 1-90, где олигонуклеотид содержит последовательность нуклеиновых оснований, которая комплементарна по меньшей мере части последовательности гена MAPT или гибридизируется с ней.

100. Способ по п. 99, где таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера.

101. Способ модулирования экспрессии гена MAPT посредством приведения целевой нуклеиновой кислоты в контакт с антисмысловым соединением, содержащим олигонуклеотид, или композицией, содержащей указанный олигонуклеотид по любому из пп. 1-90, где олигонуклеотид содержит последовательность нуклеиновых оснований, которая комплементарна по меньшей мере части гена MAPT или гибридизируется с ней.

102. Способ по любому из пп. 98, 99 и п. 101, где часть гена MAPT представляет собой экзон 5.

По доверенности