

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DISMINUIR LA EXPRESIÓN DE TAU

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Nro. 62/270165, presentada el 21 de diciembre de 2015, que se incorpora por referencia en este documento en su totalidad.

CAMPO TÉCNICO

- 10 La presente invención proporciona composiciones y métodos para disminuir la expresión de proteína y ARNm de tau. Estas composiciones y métodos son útiles para tratar enfermedades asociadas a tau.

ANTECEDENTES

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

- 25 Existen por lo menos seis isoformas de tau en el cerebro humano, que varían de 352 a 441 residuos de aminoácidos de longitud. Las isoformas de tau se derivan de un único gen MAPT (proteína tau asociada a microtúbulos) ubicado en el cromosoma 17. La transcripción de MAPT atraviesa un complejo corte y empalme alternativo y regulado, lo que da lugar a múltiples especies de ARNm. Los exones 2 y 3 de MAPT codifican una secuencia de 29 o 58 aminoácidos, respectivamente,

y así, el corte y empalme alternativo de los exones 2 y/o 3 conduce a la inclusión de cero, una o dos copias del dominio ácido de 29 aminoácidos N-terminal , que se conocen como 0N, 1N o 2N tau, respectivamente. El exón 10 de MAPT codifica un dominio de unión a microtúbulo, por lo que la inclusión del exón 10 conduce a la presencia de un dominio de unión a microtúbulo adicional. Dado que hay tres dominios de unión a microtúbulo en otras partes de tau, las isoformas de tau que incluyen el exón 10 se denominan "4R tau", lo que significa la proteína tau con cuatro repeticiones del dominio de unión a microtúbulo. Las isoformas de tau sin el exón 10 se denominan "3R tau", lo que significa la proteína tau con tres repeticiones del dominio de unión a microtúbulos. Las isoformas 4R tau presumiblemente se unen a microtúbulos mejor que las isoformas 3R tau, ya que tienen un dominio más de unión a microtúbulo. La relación de 3R tau a 4R tau está regulada por el desarrollo, donde los tejidos fetales expresan exclusivamente 3R tau, y los tejidos humanos adultos que expresan niveles aproximadamente iguales de 3R tau y 4R tau.

Tau es una fosfoproteína con aproximadamente 85 sitios de fosforilación potenciales (Ser, Thr o Tyr) en la isoforma tau más larga (Pedersen y Sigurdsson, Trends in Molecular Medicine 2015, 21 (6): 394). Se ha informado fosforilación en aproximadamente la mitad de estos sitios en proteínas tau normales. Tau es dinámicamente fosforilada y desfosforilada durante el ciclo celular. Tau solo puede asociarse con microtúbulos en su forma desfosforilada, y así, la fosforilación de tau actúa como un interruptor directo de asociación–disociación de microtúbulos dentro de la neurona. En condiciones patológicas, la proteína tau se hiperfosforila, de modo de producir una pérdida de unión a tubulina y la desestabilización de microtúbulos, seguida de la agregación y el depósito de tau en ovillos neurofibrilares patógenos. Se han identificado también fragmentos de escisión de proteasa de tau (Asp13, Glu391 y Asp421) en ovillos neurofibrilares.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

Se proporcionan en la presente solicitud oligonucleótidos antisentido que se dirigen a la proteína tau asociada a microtúbulo humana (MAPT, conforme a sus siglas en inglés), composiciones que comprenden los oligonucleótidos antisentido, y métodos para disminuir la expresión de proteína y ARNm de tau usando estos oligonucleótidos antisentido. Las composiciones y los métodos proporcionados en este documento son útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas a tau.

En un aspecto, se proporcionan en esta solicitud oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleobases que tiene por lo menos 70% (por ejemplo, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%) de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias de nucleobases proporcionadas en las Tablas 2–17, donde C en cualquiera de las secuencias de nucleobases es o bien citosina o 5–metilcitosina, y donde por lo menos un nucleótido del oligonucleótido tiene una modificación 2'. Estos oligonucleótidos son oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT humana. La modificación 2' puede seleccionarse del grupo que consiste en 2'–fluoro, 2'–deoxi–2'–fluoro, 2'–O–metilo, 2'–O–metoxietilo (2'–O–MOE), 2'–O–aminopropilo (2'–O–AP), 2'–O–dimetiloaminoetilo (2'–O–DMAOE), 2'–O–dimetiloaminopropilo (2'–O–DMAP), 2'–O–dimetiloaminoetiloxietilo (2'–O–DMAEOE) y 2'–O–N–metiloacetamido (2'–O–NMA). En algunas formas de realización, la modificación 2' es 2'–O–metoxietilo (2'–O–MOE). En algunas formas de realización, cada C en cualquiera de las secuencias de nucleobases es 5–metilcitosina.

En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se proporcionan en esta solicitud son de 12 a 30 nucleobases de longitud. Por ejemplo, un oligonucleótido antisentido que se dirige a MAPT puede comprender 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleobases. En

algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT son de 12 a 25 nucleobases de longitud. Por ejemplo, un oligonucleótido antisentido que se dirige a MAPT puede comprender 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleobases. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT son de 15 a 20 nucleobases de longitud. Por ejemplo, un oligonucleótido antisentido que se dirige a MAPT puede comprender 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases.

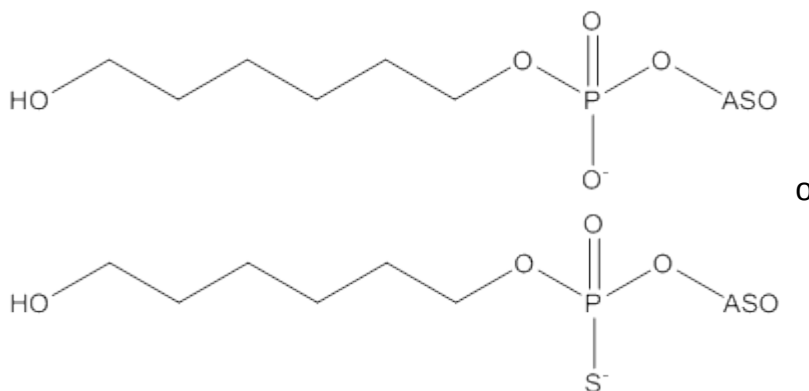
En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT que se proporcionan en esta solicitud son bloqueadores estéricos. Dichos oligonucleótidos antisentido disminuyen la expresión de proteína y/o ARNm tau independientemente de ARNasa H. La unión de internucleósido de bloqueadores estéricos puede ser o bien unión de fosfodiéster o fosforotioato. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT que se proporcionan en esta solicitud son bloqueadores estéricos que comprenden una secuencia de nucleobases que tiene por lo menos 70% (por ejemplo, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias proporcionadas en las Tablas 2–8, donde C en cualquiera de las secuencias de nucleobases es o bien citosina o 5–metilcitosina, y donde cada nucleótido del oligonucleótido tiene una modificación 2'. En algunas formas de realización, un oligonucleótido antisentido que se dirige a MAPT comprende una secuencia de nucleobases que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias proporcionadas en las Tablas 2–8. En algunas formas de realización, un oligonucleótido antisentido que se dirige a MAPT comprende una secuencia de nucleobases que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias de nucleobases proporcionadas en las Tablas 2–8. En algunas formas de realización, un

oligonucleótido antisentido que se dirige a MAPT comprende cualquiera de las secuencias de nucleobases proporcionadas en las Tablas 2–8. En algunas formas de realización, un oligonucleótido antisentido que se dirige a MAPT consiste en cualquiera de las secuencias de nucleobases proporcionadas en las Tablas 2–8.

- 5 En algunas formas de realización, cada C en cualquiera de las secuencias de nucleobases es 5–metilcitosina.

En algunas formas de realización, un oligonucleótido antisentido que se dirige a MAPT tiene modificación 2'–O–MOE en cada subunidad de nucleótido.

- En algunas formas de realización, un oligonucleótido antisentido que se dirige a MAPT comprende un enlazador unido al extremo 3' del oligonucleótido a través de un puente de fosfato, y el oligonucleótido tiene cualquiera de las siguientes estructuras:



- En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT que se proporcionan en esta solicitud son gápmeros, que tienen un segmento central de 2'–desoxirribonucleótidos contiguos, posicionado entre dos segmentos de ala en los extremos 5' y 3' (también denominados ala 5' y ala 3', respectivamente). Dichos oligonucleótidos antisentido disminuyen la expresión de proteína y/o ARNm tau mediante la activación de ARNasa H. La unión de internucleósido de gápmeros puede ser de uniones de fosforotioato o fosfodiéster. En algunas formas de realización, los gápmeros comprenden un tramo de por lo menos cinco (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) 2'–desoxirribonucleótidos

contiguos, y los segmentos de ala 5' y 3' comprenden uno o más nucleótidos modificados 2'. En algunas formas de realización, dicho oligonucleótido comprende por lo menos siete (por ejemplo, 7, 8, 9, 10, 11, 12) 2'-desoxirribonucleótidos contiguos. En algunas formas de realización, dicho oligonucleótido comprende diez
 5 2'-desoxirribonucleótidos contiguos. La modificación 2' puede seleccionarse del grupo que consiste en 2'-fluoro, 2'-deoxi-2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropilo (2'-O-AP), 2'-O-dimetiloaminoetilo (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetiloaminopropilo (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetiloaminoetiloxietilo (2'-O-DMAEOE) y 2'-O-N-metiloacetamido (2'-O-NMA). En algunas formas de
 10 realización, los gápmeros comprenden nucleótido 2'-O-MOE modificado en el ala 5' y el ala 3'.

En algunas formas de realización, los gápmeros que se dirigen a tau son gápmeros 5-10-5 que tienen 20 nucleósidos de longitud, donde el segmento de brecha gap central comprende diez 2'-desoxinucleósidos contiguos, flanqueados
 15 por el ala 5' y el ala 3', donde cada ala comprende cinco nucleósidos cada uno con una modificación 2'-O-MOE.

En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT que se proporcionan en esta solicitud son gápmeros que comprenden una secuencia de nucleobases que tiene por lo menos 70% (por
 20 ejemplo, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias proporcionadas en las Tablas 9-15 y 17, donde C en cualquiera de las secuencias de nucleobases es o bien citosina o 5-metilcitosina, y donde por lo menos un nucleótido del oligonucleótido tiene una
 25 modificación 2'. En algunas formas de realización, un oligonucleótido antisentido que se dirige a MAPT comprende una secuencia de nucleobases que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias

proporcionadas en las Tablas 9–15 y 17. En algunas formas de realización, un oligonucleótido antisentido que se dirige a MAPT comprende una secuencia de nucleobases que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias de nucleobases proporcionadas en las Tablas 9–15 y 17. En

5 algunas formas de realización, un oligonucleótido antisentido que se dirige a MAPT comprende cualquiera de las secuencias de nucleobases proporcionadas en las Tablas 9–15 y 17. En algunas formas de realización, un oligonucleótido antisentido que se dirige a MAPT consiste en cualquiera de las secuencias de nucleobases proporcionadas en las Tablas 9–15 y 17. En algunas formas de realización, los

10 oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT que se proporcionan en esta solicitud son gápmers 5–10–5 que comprenden cualquiera de las secuencias de nucleobases proporcionadas en cualquiera de las Tablas 9–15 y 17, donde el primero al quinto nucleótidos comprenden cada uno un nucleósido 2'–O–MOE modificado, donde el sexto al decimoquinto nucleótidos comprenden cada uno un

15 2'–desoxinucleósido, y donde el decimosexto al vigésimo nucleótidos comprenden cada uno un nucleósido 2'–O–MOE modificado. En algunas formas de realización, cada C en cualquiera de las secuencias de nucleobases es 5–metilcitosina.

En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido que se dirige a MAPT comprende una secuencia de nucleobases seleccionada de cualquiera de

20 SEQ ID NOs: 284, 313, 329, 335, 366, 384, 386, 405, 473 y 474. En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido que se dirige a MAPT comprende una secuencia de nucleobases que tiene por lo menos 90% (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 284. En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido

25 que se dirige a MAPT comprende SEQ ID NO: 284.

En otro aspecto, se proporcionan en esta solicitud oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleobases que es complementaria a por lo menos

12 nucleobases contiguas de cualquiera de SEQ ID NOs: 487–506, con 1, 2 o 3 apareamientos erróneos, donde por lo menos un nucleótido del oligonucleótido tiene una modificación 2'. Estos oligonucleótidos son oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT. En algunas formas de realización, dicho oligonucleótido

5 comprende una secuencia de nucleobases que es 100% complementaria a por lo menos 12 nucleobases contiguas de cualquiera de SEQ ID NOs: 487–506. En algunas formas de realización, dicho oligonucleótido comprende una o más 5–metilcitosinas. En algunas formas de realización, dicho oligonucleótido tiene una modificación 2'. La modificación 2' puede seleccionarse del grupo que consiste en

10 2'–fluoro, 2'–deoxi-2'–fluoro, 2'–O–metilo, 2'–O–metoxietilo (2'–O–MOE), 2'–O–aminopropilo (2'–O–AP), 2'–O–dimetiloaminoetilo (2'–O–DMAOE), 2'–O–dimetiloaminopropilo (2'–O–DMAP), 2'–O–dimetiloaminoetiloetilo (2'–O–DMAEOE) y 2'–O–N–metiloacetamido (2'–O–NMA). En algunas formas de realización, la modificación 2' es 2'–O–metoxietilo (2'–O–MOE). En algunas formas

15 de realización, dicho oligonucleótido comprende por lo menos cinco (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) 2'–desoxirribonucleótidos contiguos. En algunas formas de realización, dicho oligonucleótido comprende por lo menos siete (por ejemplo, 7, 8, 9, 10, 11, 12) 2'–desoxirribonucleótidos contiguos. En algunas formas de realización, dicho oligonucleótido comprende diez 2'–desoxirribonucleótidos

20 contiguos.

En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT que se proporcionan en esta solicitud son capaces de disminuir el nivel de expresión de proteína o ARNm tau por lo menos el 30% *in vitro*.

En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se

25 dirigen a MAPT que se proporcionan en esta solicitud son capaces de disminuir el nivel de expresión de proteína o ARNm tau por lo menos el 30% *in vivo*.

En otro aspecto, se proporcionan en esta solicitud composiciones que comprenden cualquiera de los oligonucleótidos antisentido que se describen en la presente solicitud y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan métodos para
5 disminuir el nivel de expresión de tau en un sujeto, por ejemplo, un sujeto afectado con una enfermedad asociada a tau o sensible a ella, mediante la administración, al sujeto, de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los oligonucleótidos antisentido descritos en este documento. En algunas formas de realización, dichos métodos pueden incluir la administración de un segundo agente,
10 al sujeto. En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido dirigido a MAPT puede administrarse al sujeto a través de una vía intratecal, intracraneal, intranasal, oral, intravenosa o subcutánea. En algunas formas de realización, el sujeto es un ser humano.

También se proporcionan oligonucleótidos antisentido como se describe en
15 este documento para el uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a tau en un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un sujeto afectado con una enfermedad asociada a tau o sensible a ella. Se incluye además el uso de los oligonucleótidos antisentido o la composición farmacéutica descrita en este documento para tratar una enfermedad asociada a tau en un sujeto que lo necesita. La presente
20 divulgación también incluye el uso de los oligonucleótidos antisentido descritos en la presente solicitud en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a tau en un sujeto que lo necesita.

La enfermedad asociada a tau puede seleccionarse de enfermedad de
Alzheimer (AD, conforme a sus siglas en inglés), esclerosis lateral
25 amiotrófica/complejo de parkinsonismo–demencia (ALS–PDC, conforme a sus siglas en inglés), demencia de grano argirofílica (AGD, conforme a sus siglas en inglés), angiopatía amiloide de tipo británico, angiopatía amiloide cerebral,

encefalopatía traumática crónica (CTE, conforme a sus siglas en inglés), degeneración corticobasal (CBD, conforme a sus siglas en inglés), enfermedad de Creutzfeldt–Jakob (CJD, conforme a sus siglas en inglés), demencia pugilística, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, síndrome de Down, síndrome de

5 Dravet, epilepsia, demencia frontotemporal (FTD, conforme a sus siglas en inglés), demencia frontotemporal con parkinsonismo relacionado con el cromosoma 17 (FTDP–17, conforme a sus siglas en inglés), degeneración lobular frontotemporal, ganglioglioma, gangliocitoma, enfermedad de Gerstmann–Straussler–Scheinker, enfermedad de Hallervorden–Spatz, enfermedad de Huntington, miositis por

10 cuerpos de inclusión, encefalopatía por plomo, enfermedad de Lytico–Bodig, meningioangiomatosis, atrofia multisistémica, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann–Pick tipo C (NP–C), enfermedad de neuronas motoras no guameña con ovillos neurofibrilares, enfermedad de Pick (Pi D), parkinsonismo posencefálico, angiopatía amiloide cerebral con proteína priónica, gliosis subcortical progresiva,

15 parálisis supranuclear progresiva (PSP), panencefalitis esclerosante subaguda, demencia solo con ovillos, demencia con ovillo predominante, demencia por infarto múltiple, accidente cerebrovascular isquémico o esclerosis tuberosa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 Las Figs. 1A–1C muestra la caracterización física de oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT. La Fig. 1A muestra la estructura del oligonucleótido antisentido (ASO) que comprende la SEQ ID NO: 284, con la fórmula C₂₃₀H₃₂₁N₇₂O₁₂₀P₁₉S₁₉ y el peso molecular esperado de 7212,3 Da. La Fig. 1B muestra los datos de la cromatografía líquida–espectrometría de masas

25 (LC–MS, conforme a sus siglas en inglés) de ASO que comprende la SEQ ID NO: 284, con una masa de pico medida de 7214.3. La Fig. 1C muestra el informe de pico de deconvolución de LC–MS para ASO que comprende la SEQ ID NO: 284.

Las Figs. 2A–2E muestran el nivel de expresión del ARNm y la proteína tau humanos en una línea de ratón transgénica BAC hTau representativa, antes y después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido. La Fig. 2A es representativa de los resultados de la RT–PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, conforme a sus siglas en inglés), que muestran que las seis transcripciones de tau humanas se encontraron en el prosencéfalo de los ratones transgénicos BAC hTau (línea transgénica 510, ratones hembra de dos meses de edad). Los exones 2, 3 y 10 son empalmados alternativamente, de modo de producir seis isoformas de tau: 2–3–10–; 2+3–10–; 2+3+10–; 2–3–10+; 2+3–10+; 2+3+10+. 4R representa isoformas tau con exón 10, 3R representa isoformas tau sin exón 10; 0N representa isoformas tau sin exón 2 ni exón 3; 1N representa isoformas tau con exón 2 o exón 3; 2N representa isoformas de tau tanto con exón 2 como con exón 3. La Fig. 2B es una transferencia de Western representativa que muestra seis isoformas de proteína tau que varían de 352 a 441 aminoácidos con pesos moleculares de 48 a 67 kD. Se diferencian en (1) inclusión de cero, una o dos inserciones de una parte N–terminal de 29 aminoácidos (0N, 1N o 2N), o (2) inclusión de tres o cuatro dominios de unión a microtúbulos (3R o 4R). La Fig. 2C es una imagen de inmunohistoquímica representativa que muestra la distribución axonal normal de la tau humana en el cerebro del ratón transgénico BAC hTau, tal como se tiñó mediante un anticuerpo específico de tau humano.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se proporcionan aquí oligonucleótidos antisentido que se dirigen a la proteína tau asociada a microtúbulos (MAPT), las composiciones que comprenden los oligonucleótidos antisentido y los métodos para disminuir la expresión de tau usando estos oligonucleótidos antisentido. Las composiciones y métodos proporcionados en este documento son útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas a tau.

Definiciones.

Como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, lo que incluye sus mezclas.

Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, que incluyen rangos, son aproximaciones que varían (+) o (–) en incrementos de 0,1. Debe entenderse, aunque no siempre se indique explícitamente, que todas las designaciones numéricas están precedidas por el término "alrededor de". También debe entenderse, aunque no siempre sea explícitamente establecido, que los reactivos descritos en este documento son meramente ejemplos, y que sus equivalentes son conocidos en la técnica.

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

Como se usa en este documento, "2'–O–metoxietilo", "2'–MOE" o "2'–OCH₂CH₂–OCH₃" se refiere a una modificación de O–metoxietilo de la posición 2' de un anillo de furanosa. Un azúcar modificado 2'–O–metoxietilo es un azúcar modificado. Un "nucleósido/nucleótido 2'–MOE" o "nucleósido/nucleótido 2'–O–metoxietilo" se refiere a un nucleósido/nucleótido que comprende un resto azúcar modificado 2'–MOE.

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

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

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

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

Como se usa en el presente documento, el término "gápmero" se refiere a un oligonucleótido antisentido quimérico que comprende un segmento de brecha gap central que consiste en 2'-desoxirribonucleótidos contiguos, que es capaz de activar ARNasa H, flanqueado por dos segmentos de ala en los extremos 5' y 3', donde cada uno comprende uno o más nucleótidos modificados, que confieren una mayor resistencia a la degradación de la nucleasa.

El término "hibridación" se refiere al emparejamiento de bases de hebras de ácido nucleico complementarias y la formación de una estructura de dupla. La hibridación puede tener lugar entre hebras de ácido nucleico totalmente complementarias o entre hebras de ácido nucleico "sustancialmente

complementarias" que contienen regiones minoritarias de emparejamiento o apareamiento erróneo. Aunque no se limita a un mecanismo particular, el mecanismo más común de emparejamiento implica enlaces de hidrógeno, que pueden ser enlace de hidrógeno de Watson–Crick, Hoogsteen o Hoogsteen invertido, entre las nucleobases complementarias de las hebras de ácido nucleico. Por ejemplo, la adenina y la timina son nucleobases complementarias que se aparean mediante la formación de enlaces de hidrógeno. La hibridación puede ocurrir bajo diversas circunstancias de rigurosidad. Como se usa en este documento, la hibridación se refiere al emparejamiento de bases de hebras de ácido nucleico complementarias y la formación de una estructura de dupla por lo menos en una condición de rigurosidad relativamente baja; por ejemplo, puede usarse la hibridación en 2X SSC (cloruro de sodio 0,3 M, citrato de sodio 0,03 M), 0,1% SDS (dodecil sulfato sódico) a 37°C, seguido de lavado en solución que contiene 4 X SSC, SDS al 0,1% a 37°C, con un lavado final en 1 X SSC a 45°C.

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

El término "unión de internucleósido" se refiere al enlace químico entre nucleósidos.

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

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

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

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

El término "unión de fosforotioato" se refiere a una unión entre nucleósidos donde el enlace de fosfodiéster se modifica reemplazando uno de los átomos de oxígeno que no forman puentes, con un átomo de azufre.

El término "hebra sentido" se refiere a la hebra de codificación, hebra más,
15 o hebra no patrón de la molécula de ADN que consiste en una estructura de doble hebra. La hebra codificante tiene la misma secuencia que la secuencia de ARNm, excepto que la timina (T) en el ADN está reemplazada por uracilo (U) en el ARN. Una "hebra antisentido" se refiere a la hebra no codificante o hebra patrón de la molécula de ADN, que actúa como patrón para la síntesis de ARNm. Por lo tanto,
20 la secuencia de la hebra antisentido es complementaria a la secuencia de la hebra sentido y ARNm (U en ARN en lugar de T).

Como se usa en el presente documento, el término "bloqueador estérico" se refiere a un oligonucleótido antisentido que se hibrida con un ácido nucleico objetivo (por ejemplo, una secuencia genómica objetivo, molécula de pre-ARNm, o
25 molécula de ARNm), e interfiere con la transcripción, el empalme y/o la traducción del ácido nucleico objetivo sin activar la ARNasa H.

Como se usa en el presente documento, "direccionamiento" o "dirigido" se refiere al diseño y la selección de un oligonucleótido antisentido que puede hibridar específicamente con un ácido nucleico objetivo, por ejemplo, una secuencia genómica objetivo, molécula de pre-ARNm, o molécula de ARNm, o su fragmento o variante, y modular la transcripción, el empalme y/o la traducción del ácido nucleico objetivo.

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

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

```

1 ggacggccga gcggcagggc gctcgcgcgc gccactagt ggccggagga gaaggctccc
61 gcggaggccg cgtgcccgc cccctccct ggggaggctc gcgttcccgc tgctcgcgc
121 tgcccgccc gccggcctca ggaacgcgc ctctcgcgc gcgcgcgcgc tcgcagtcac
181 cgccaccac cagctccgc accaacagca gcgcgcgcgc caccgccac cttctgcgc
241 cgccaccaca gccacctct cctcctcgc tctcctcgc cgtcctcgc tctgtcgc
301 atcagtgaa ctttgaacca ggatggctga gcccgcag gagttcgaag tgatggaaga
361 tcacgctggg acgtacgggt tgggggacag gaaagatcag gggggctaca ccatgcacca
421 agaccaagag ggtgacacgg acgtggcct gaaagaatct cccctgcaga cccccactga
481 ggacggatct gaggaaccgg gctctgaaac ctctgatct aagagcactc caacagcgga
541 agatgtgaca gcacccttag tggatgagg agtcccggc aagcaggctg ccgcgcagcc
601 ccacacggag atcccagaag gaaccacagc tgaagaagca ggcatggag acacccccag
661 cctggaagac gaagctgctg gtcacgtgac ccaagagcct gaaagtggta agtggtcca
721 ggaaggcttc ctccgagagc caggccccc aggtctgagc caccagctca tgcggcat
781 gcctgggct cccctctgc ctgaggccc cagagaggcc acacccaac ctteggggac
841 aggacctgag gacacagagg gcggcccca cgccctgag ctgctcaagc accagcttct
901 aggagacctg caccaggagg ggccgcccgt gaagggggca gggggcaaag agaggccggg

```

961 gagcaaggag gaggtggatg aagaccgcga cgtcgatgag tctcccccc aagactcccc
 1021 tcctccaag gcctccccag cccaagatgg ggggctccc cagacagccg ccagagaagc
 1081 caccagcatc ccaggcttcc cagcggaggg tgccatcccc ctccctgtgg atttctctc
 1141 caaagtttcc acagagatcc cagcctcaga gcccagcggg ccagtgtag ggcgggcca
 1201 agggcaggat gccccctgg agttcacgtt tcacgtggaa atcacacca acgtgcagaa
 1261 ggagcaggcg cactcggagg agcatttggg aagggtgca ttccagggg cccctggaga
 1321 ggggccagag gcccggggcc cctcttggg agaggacaca aaagaggctg acctccaga
 1381 gccctctgaa aagcagcctg ctgctgctcc gggggggaag cccgtcagcc gggccctca
 1441 actcaaagct cgcattgtca gtaaaagcaa agacgggact ggaagcagtg aaaaaaagc
 1501 caagacatcc acacgttctc ctgctaaaac cttgaaaaat aggccttgcc ttagecccaa
 1561 acacccact cctgtagct cagacctct gatcaacc tccagccctg ctgtgtgcc
 1621 agagccact tctctcta aatacgtctc ttctgtcact tccgaactg gcagttctg
 1681 agcaaaggag atgaaactca agggggctga tggtaaacg aagatcgcca caccgcggg
 1741 agcagccct ccaggccaga agggccaggc caacgccacc aggattccag caaaaaccc
 1801 gcccgtcca aagacaccac ccagctctg gactaagcaa gtccagagaa gaccacccc
 1861 tgcagggccc agatctgaga gaggtgaacc tcaaaatca ggggatcgca gcggtacag
 1921 cagcccgccg tcccaggca ctccggcag ccgtcccgcc accccgtccc ttcaacccc
 1981 acccaccggg gagcccaaga aggtggcagt ggtccgtact ccaccaagt cgcgtcttc
 2041 cgccaagagc cgctgcaga cagcccccgt gccatgcca gacctgaaga atgtcaagtc
 2101 caagatcgcc tccactgaga acctgaagca ccagccggga ggcgggaagg tgcagataat
 2161 taataagaag ctgattctta gcaacgtcca gtccaagtgt ggctcaaagg ataataca
 2221 acacgtcccg ggagggcgca gtgtgcaaat agtctacaaa ccagttgacc tgagcaaggt
 2281 gacctcaag tgtggctcat taggcaacat ccatcataaa ccaggagggtg gccagggtga
 2341 agtaaaatct gagaagcttg actcaagga cagagtccag tcgaagattg ggtccctgga
 2401 caatatcacc cagtcctctg ggggaggaaa taaaagatt gaaaccaca agctgacctt
 2461 ccgcgagaac gccaaagcca agacagacca cggggcgagg atcgtgtaca agtcgccagt
 2521 ggtgtctggg gacacgtctc cacggcatct cagcaatgtc tctccaccg gcagcatcga
 2581 catggtagac tcgcccagc tcgccagct agctgacgag gtgtctgcct cctgggcaa
 2641 gcagggtttg tcatcaggcc cctggggcgg tcaataattg tgagaggag agaatgagag
 2701 agtgtggaag aaaaaagaat aatgaccggg ccccgccct ctgccccag ctgctcctg
 2761 cagttcggtt aattggftaa tacttaacc tcttttgc actcggttt ggctcgggac
 2821 ttcaaaatca gtgatgggag taagagcaaa ttcatcttt ccaattgat ggggtggcta
 2881 gtaataaat atttaaaaa aaacattcaa aaacatggcc acatccaaca ttctcagg
 2941 caattcttt tgattcttt ttctcccc tccatgtaga agaggagaa ggagaggctc
 3001 tgaagctgc ttctggggga ttcaaggga ctgggggtgc caaccacctc tggcctgtt
 3061 gtgggggtgt cacagaggca gtggcagcaa caaaggattt gaaacttgt gtgtctgtg
 3121 agccacaggc agacgatgc aacctgtgt gagtgtgacg ggggttggg tgggcgagg
 3181 ggccacgggg gaggccagg caggggctgg gcagaggga gaggaagcac aagaagtggg
 3241 agtgggagag gaagccacgt gctggagagt agacatccc ctcttgccg ctgggagagc
 3301 caaggcctat gccacctgca gcgtctgagc ggccgctgt ccttggtggc cgggggtggg
 3361 ggctgtctgt gggtcagtgt gccacctct gcagggcagc ctgtgggaga agggacagcg
 3421 ggtaaaaaga gaaggcaagc tggcaggagg gtggcacttc gtggatgacc tcttagaaa
 3481 agactgacct tgatgtctg agagcgtgg cctctctc cctccctgca gggtagggg
 3541 cctgagtga ggggctccc tctgtccac agaaacctg tttattgag ttctgaaggt
 3601 tggaaactgt gccatgatt tggccactt gcagacctg gacttaggg ctaaccagt
 3661 ctcttgtaa ggactgtgc ctctgggag acgtccacc gttccaagc ctgggcaact
 3721 ggcatctctg gagtgtgtg gggctggga ggcaggtccc gagccccctg tcttccac
 3781 ggccactgca gtcacccgt ctgcggcgt gtgtgtgtgt ctgccgtgag agccaatca
 3841 ctgctatac cctcatcac acgtcacaat gtccgaatt cccagctca cacccttc
 3901 tcagtaatga cctggttg tgcaggagg tacctactc atactaggg tgaatfaag

3961 ggaaggcaaa gtccaggcac aagagtggga cccagcctc tcaactcag ttcaactcat
 4021 ccaactggga cctcaccac gaatctcatg atctgattcg gtccctgtc tctcctccc
 4081 gtcacagatg tgagccaggg cactgctcag ctgtgaccct aggtgtttct gccttgtga
 4141 catggagaga gccctttccc ctgagaaggc ctggccctt cctgtgctga gccacagca
 4201 gcaggctggg tgtcttgggt gtcagtgtg gcaccaggat ggaagggcaa ggcaccagg
 4261 gcaggccac agtcccgtg tccccactt gcaccctagc ttgtagctgc caacctcca
 4321 gacagcccag cccgctgctc agctccacat gcatagtatc agccctccac acccgacaaa
 4381 ggggaacaca ccccttggga aatgttctt tccccagt cccagctgga agccatgctg
 4441 tctgtctgc tggagcagct gaacatatac atagatgttg cctgccctc cccatctgca
 4501 cctgttgag ttgtagtgg attgtctgt ttatgcttg attcaccaga gtgactatga
 4561 tagtgaag aaaaaaaaaa aaaaaagg acgcatgtat cttgaaatgc ttgaaagg
 4621 gttttaacc caccctcag aggtgtctt caccaccaca ctgggactcg tgggctgt
 4681 gtgtgccac cctgtgggg cctccaaagt ttgaaaggc ttctcagc acctgggacc
 4741 caacagagac cagcttctag cagctaagg ggcgttcag ctgtgacga ggcctgaagc
 4801 acaggattag gactgaagcg atgatgtcc ctccctact tccctggg gctccctgtg
 4861 tcagggcaca gactaggtct tgggctgggt ctggctgcg gcgcgaggat ggttctct
 4921 ggtcatagcc cgaagtcca tggcagtc aaaggaggct tacaactcct gcatcacaag
 4981 aaaaaggag ccactgccag ctggggggat ctgcagctcc cagaagctcc gtgagcctc
 5041 gccaccctc agactgggt cctctcaag ctgccctct ggaggggcag cgcagcctc
 5101 caccaagggc cctgcgacca cagcaggat tgggatgaat tgctgtctt ggatctgctc
 5161 tagaggccca agctgctgc ctgaggaagg atgactgac aagtcaggag aactgttcc
 5221 caaagcctg accagagcac ctcagccgc tgacctgca caaactccat ctgctgccat
 5281 gagaaaagg aagccgctt tgcaaacat tctgcctaa agaaactcag cagcctcagg
 5341 cccaattctg cacttctgg ttgggtaca gtaaaaggc accctgaggg acttggcagt
 5401 agaaatccag ggcctcccc ggggctggca gcttctgtg cagctagagc ttacctgaa
 5461 aggaagtctc tgggccaga actctccacc aagagcctc ctgccgtcg ctgagtcaca
 5521 gcaattctc taagtgaag ggatctgaga aggagaagg aatgtgggt agattgtg
 5581 gtggttag atagcccc ctcactctg ccaacagtt cggctgcat tcttcacga
 5641 cctcggtcc tctctgaa gttctgtc cctgtcttc agcaccatgg gccttctat
 5701 acggaaggct ctgggatc cccctgtg ggcaggctt tggggcagc ctaagatcat
 5761 ggttaggt gatcagctt ggcagataa ttgaaaagg acgtggctt gtgacttaa
 5821 atgaggacaa tccccagg gctgggact cctccctcc cctacttct cccactgca
 5881 gagccagt ccttgggtg gctagatagg atatactga tccgggctc tcaagctgc
 5941 tgactcatt tatcaatgt tcaattaaa ttgactcag tggtagact gtatcctgt
 6001 tgctattgt tttgtgcta tggggggagg gggagggaat gtgtaagata gtaacatgg
 6061 gcaaaggag atctgggt gcagcacta aactgcctc taaccttt catgattca
 6121 accacattg ctagaggag ggagcagca cggagttag gcccttggg gtttcttt
 6181 tccactgaca ggtttcca ggcagctgg tagttcatc cctcccagc caggtgcagg
 6241 cgtaggaata tggacatct gttgcttgg cctgtgccc ttttcagg gtcctaagcc
 6301 cacaatcat cctccctaag acctggcat ccttccctt aagcgttg cactctgtg
 6361 ccactctca cactggctc agacacacag cctgtgctt tggagctgag atactctgt
 6421 tcacctcct catcttgt ctccaagtaa agccagagg tggggcgag ggcagaggg
 6481 atacctgcg tctccatct acagacctg agctcataa aactctgat ttctctcag
 6541 ctttgaag ggttaccct ggcactggc tagagctca cctcctaata gacttagcc
 6601 catgatttg ccatgtgag caggactatt tctggcatt gcaagtcca tgattctc
 6661 ggtaattct aggtggggg gagggacatg aatcatct agcttagct tctgtctg
 6721 aatgtctata tagtgtatt tgtgtttta caatgatt acactgact ttgctgtaa
 6781 agtgaattg gaaataaagt tattactctg attaaa (SEQ ID NO: 305)

Proteína tau asociada a microtúbulos de *Homo sapiens* isoforma 6

(NP_001116538.2):

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD
 AGLKESPLQT PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA
 AQPHTIEPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQEPESGK VVQEGFLREP
 GPPGLSHQLM SGMPGAPLLP EGPREATRQP SGTGPEDTEG GRHAPELLKH
 QLLGDLHQEG PPLKGAGGKE RPGSKEEVDE DRDVEDESSPQ DSPPSKASPA
 QDGRPPQTAA REATSIPGFP AEGAIPLPVD FLSKVSTEIP ASEPDGPSVG
 RAKGQDAPLE FTFHVEITPN VQKEQAHSEE HLGRAAFPGA PGEGPEARGP
 SLGEDTKEAD LPEPSEKQPA AAPRGKPVSR VPQLKARMVS KSKDGTGSDD
 KKAKTSTRSS AKTLKNRPCL SPKHPTPGSS DPLIQPSSPA VCPEPPSSPK
 YVSSVTSRTG SSGAKEMKLLK GADGKTKIAT PRGAAPPQK GQANATRIPA
 KTPPAPKTPP SSATKQVQRR PPPAGPRSER GEPPKSGDRS GYSSPGSPGT
 PGSRSRTPSL PTPPTREPKK VAVVRTPPKS PSSAKSRLQT APVPMPLDN
 VKSKIGSTEN LKHQPGGGKV QIINKKLDLS NVQSKCGSKD NIKHVPGGGS
 VQIVYKPVDL SKVTSKCGSL GNIHHKPGGG QVEVKSEKLD FKDRVQSKIG
 SLDNITHVPG GGNKKIETHK LTFRENAKAK TDHGAEIVYK SPVVSQDTSP
 RHLSNVSSSTG SIDMVDSPQL ATLADEVSSAS LAKQGL (SEQ ID NO: 306)

Las secuencias de ARNm y proteína de las otras isoformas tau humanas

5 pueden hallarse en GenBank con los siguientes números de acceso:

tau isoforma 1: NM_016835.4 (ARNm) → NP_058519.3 (proteína);

tau isoforma 2: NM_005910.5 (ARNm) → NP_005901.2 (proteína);

tau isoforma 3: NM_016834.4 (ARNm) → NP_058518.1 (proteína);

tau isoforma 4: NM_016841.4 (ARNm) → NP_058525.1 (proteína);

10 tau isoforma 5: NM_001123067.3 (ARNm) → NP_001116539.1 (proteína);

tau isoforma 7: NM_001203251.1 (ARNm) → NP_001190180.1 (proteína);

tau isoforma 8: NM_001203252.1 (ARNm) → NP_001190181.1 (proteína).

De acuerdo con esta solicitud, proteína tau humana además contempla proteínas que tienen sobre su longitud total por lo menos alrededor de 70%, 71%,

15 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%,
 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o
 100% de identidad de secuencia con cualquiera de las isoformas tau. Las
 secuencias de proteínas tau de murino, macaco y otros animales se conocen en la
 técnica.

El término "enfermedad asociada a tau" incluye, sin limitación, una enfermedad asociada con la expresión, secreción, fosforilación, escisión, y/o agregación anormal de la proteína tau. Las enfermedades asociadas a Tau incluyen, sin limitación, enfermedad de Alzheimer (AD), esclerosis lateral

5 amiotrófica/complejo parkinsonismo–demencia (ALS–PDC), demencia de grano argirofílica (AGD), angiopatía amiloide de tipo británico, angiopatía amiloide cerebral, encefalopatía traumática crónica (CTE), degeneración corticobasal (CBD), enfermedad de Creutzfeldt–Jakob (CJD), demencia pugilística, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, síndrome de Down, síndrome de Dravet,

10 epilepsia, demencia frontotemporal (FTD), demencia frontotemporal con parkinsonismo relacionado con el cromosoma 17 (FTDP–17), degeneración lobular frontotemporal, ganglioglioma, gangliocitoma, enfermedad de Gerstmann–Straussler–Scheinker, enfermedad de Hallervorden–Spatz, enfermedad de Huntington, miositis por cuerpos de inclusión, encefalopatía por plomo, enfermedad

15 de Lytico–Bodig, meningioangiomas, atrofia multisistémica, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann–Pick tipo C (NP–C), enfermedad de las neuronas motoras no guameña con ovillos neurofibrilares, enfermedad de Pick (PiD), parkinsonismo posencefalítico, angiopatía amiloide cerebral con proteína priónica, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva (PSP), panencefalitis

20 esclerosante subaguda, demencia solo con ovillos, demencia con ovillo predominante, demencia multiinfarto, accidente cerebrovascular isquémico y esclerosis tuberosa.

El término "homología" o "identidad" se refiere a la identidad de secuencia de subunidad entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas

25 de ácido nucleico, tales como, dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas de polipéptido. Cuando una posición de subunidad en ambas moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica; por ejemplo, si una

posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas o idénticas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones apareadas u homólogas; por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias son homólogas, las dos secuencias son 50% homólogas; si el 90% de las posiciones (por ejemplo, 9 de 10), son apareadas u homólogas, las dos secuencias son 90% homólogas. El porcentaje de "identidad de secuencia" puede determinarse comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, donde el fragmento de la secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (p. ej., espacios o salientes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje puede calcularse determinando el número de posiciones en las que se produce el residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias para obtener el número de posiciones apareadas, dividiendo el número de posiciones apareadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. El resultado es el porcentaje de identidad de la secuencia objeto con respecto a la secuencia de consulta.

El término "aislado" se refiere a un estado alterado o eliminado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido presente en forma natural en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido separado parcial o completamente de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado". Una proteína o un ácido nucleico aislado puede existir en forma sustancialmente purificada, o puede existir en un entorno no nativo tal como, por ejemplo, una célula huésped.

El término "tratar" o "tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, donde el objetivo es prevenir o ralentizar un cambio o trastorno fisiológico no deseado. Para el propósito de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, sin limitación, el alivio de síntomas, la disminución del alcance de la enfermedad, el estado de enfermedad estabilizado (es decir, no empeoramiento), retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, alivio o paliación del estado de la enfermedad, y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. El "tratamiento" también puede significar la prolongación de la sobrevida, en comparación con la sobrevida esperada si no se recibe tratamiento.

El término "sujeto" se refiere a un animal, humano o no humano, para quien se proporciona el tratamiento de acuerdo con los métodos de la presente invención. Se contemplan aplicaciones veterinarias y no veterinarias. El término incluye, sin limitación, mamíferos, por ejemplo, humanos, otros primates, cerdos, roedores tales como ratones y ratas, conejos, cobayos, hámsteres, vacas, caballos, gatos, perros, ovejas y cabras. Los sujetos típicos incluyen humanos, animales de granja y mascotas domésticas como gatos y perros.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente el experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento para poner en práctica la invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en este documento se incorporan por referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones, tendrá el control. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos, y no tienen el propósito de ser limitativos.

Los detalles de una o más formas de realización de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

5 **Oligonucleótidos antisentido.**

Los oligonucleótidos antisentido (ASO, conforme a sus siglas en inglés) son agentes potentes y versátiles utilizados en una cantidad creciente de aplicaciones que incluyen reducción de ARN, detención de la traducción, inhibición de ARNm, modulación de empalme y selección del sitio de poliadenilación. Un oligonucleótido antisentido se une a un ácido nucleico objetivo cuando un número suficiente de nucleobases del oligonucleótido antisentido puede formar enlace de hidrógeno con las nucleobases correspondientes del ácido nucleico objetivo, y modula la transcripción y/o traducción del ácido nucleico objetivo. De este modo, la secuencia de nucleobases de un oligonucleótido antisentido es complementaria a la secuencia de nucleobases de un ácido nucleico objetivo, por ejemplo, una secuencia genómica objetivo, pre-ARNm o molécula de ARNm. La hibridación se produce cuando se forma enlace de hidrógeno (por ejemplo, enlace de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen invertido) entre las nucleobases complementarias del oligonucleótido antisentido y el ácido nucleico objetivo. Las nucleobases no complementarias entre un oligonucleótido antisentido y un ácido nucleico objetivo pueden tolerarse, siempre que el oligonucleótido antisentido permanezca capaz de hibridar específicamente con un ácido nucleico objetivo.

Los ASO pueden diseñarse para disminuir la expresión de una proteína objetivo mediante modos dependientes de ARNasa H o independientes de ARNasa H (ver Watts J. K., et al., J Pathol. 2012 enero; 226 (2): 365–379). Cuando un ASO que comprende un tramo contiguo de ADN se hibrida con un ARN objetivo, la heterodupla de ADN-ARN recluta ARNasa H, que escinde el ARN objetivo en la

dupla y promueve la posterior degradación de los fragmentos de ARN por nucleasas celulares. Los ASO también pueden disminuir la expresión objetivo independientemente de la ARNasa H, bloqueando estéricamente el procesamiento de pre-ARNm y/o la traducción del ARNm a la proteína.

5 Se proporcionan aquí oligonucleótidos antisentido que se dirigen a la proteína tau asociada a microtúbulos (MAPT). En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en este documento tienen una secuencia de nucleobases complementaria a un segmento de ADN genómico de MAPT, pre-ARNm o ARNm, con 1, 2, 3, 4 o 5 apareamientos erróneos. No se
10 cuenta el apareamiento erróneo entre un oligonucleótido y el ácido nucleico objetivo correspondiente si se produce emparejamiento de bases completo (por ejemplo, emparejamiento entre A y T, y entre C y G). Se produce un apareamiento erróneo cuando una nucleobase de un primer ácido nucleico no es capaz de emparejarse con la nucleobase correspondiente de un segundo ácido nucleico cuando las dos
15 secuencias están alineadas al máximo. Por ejemplo, si una posición en una primera secuencia tiene una nucleobase A, y la posición correspondiente en la segunda secuencia tiene una nucleobase (por ejemplo, C o G) que no puede emparejarse con A, se constituye un apareamiento erróneo. También se cuenta un apareamiento erróneo si una posición en una secuencia tiene una nucleobase, y la posición
20 correspondiente en la otra secuencia no tiene nucleobase. Una modificación al resto de azúcar de un nucleótido o una unión de internucleósido no se considera un apareamiento erróneo. Por lo tanto, si una secuencia comprende un G, y la nucleobase correspondiente de una segunda secuencia comprende un C modificado (por ejemplo, 5-metilcitosina), no se contaría apareamiento erróneo.

25 En el contexto de un tramo de ácido nucleico, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en este documento son complementarios a un segmento de ADN genómico de MAPT, pre-ARNm o ARNm, por lo menos, 70%, 80%, 85%, 86%,

87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% en toda la longitud del segmento. El porcentaje de complementariedad de un oligonucleótido antisentido con un ácido nucleico objetivo puede determinarse usando métodos de rutina, por ejemplo, programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineación local básica, conforme a sus siglas en inglés) o programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403 410; Zhang y Madden, Genome Res., 1997, 7, 649–656). En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en este documento tienen una secuencia de nucleobases 100% complementaria (es decir, totalmente complementaria) a un segmento de ADN genómico de MAPT, pre-ARNm o ARNm. Como se usa en el presente documento, "completamente complementario" o "100% complementario" se refiere a que cada nucleobase de un compuesto antisentido es capaz de formar un emparejamiento de bases preciso con las nucleobases correspondientes de un ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, un compuesto antisentido de 20 nucleobases es completamente complementario a una secuencia objetivo que tiene una longitud de 400 nucleobases, siempre que haya una porción correspondiente de 20 nucleobases del ácido nucleico objetivo que sea completamente complementaria al compuesto antisentido.

En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se proporcionan en esta solicitud comprenden una secuencia de nucleobases que es complementaria a por lo menos 12 nucleobases contiguas (por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 nucleobases contiguas) de cualquier secuencia proporcionada en la Tabla 1, con 1, 2 o 3 apareamientos erróneos. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se proporcionan en esta solicitud comprenden una secuencia de nucleobases que es 100% complementaria a por lo menos 12 nucleobases contiguas (por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 nucleobases contiguas) de cualquier secuencia proporcionada en la Tabla 1.

Los compuestos antisentido que se proporcionan en esta solicitud pueden tener además un porcentaje de identidad definido a una particular secuencia de nucleótidos, SEQ ID NO, o una porción de esta. De acuerdo con la presente solicitud, un oligonucleótido antisentido es idéntico a la secuencia divulgada en esta

5 solicitud si tiene la misma capacidad de apareamiento de nucleobases. Por ejemplo, un ARN que contiene uracilo en lugar de timidina en una secuencia de ADN divulgada se considerará idéntica a la secuencia de ADN, ya que tanto uracilo como timidina se aparean con adenina. Se contemplan además versiones abreviadas y extendidas de los oligonucleótidos antisentido que se describen aquí,

10 al igual que oligonucleótidos que tienen bases no idénticas en relación con los oligonucleótidos antisentido que se proporcionan en esta solicitud. Las bases no idénticas pueden ser adyacentes entre sí, o pueden dispersarse a través de todos los oligonucleótidos antisentido. El porcentaje de identidad de secuencia de un oligonucleótido antisentido puede calcularse de acuerdo con el número de bases

15 que tienen idéntico apareamiento de bases en relación con la secuencia a la cual se compara. El porcentaje de identidad de secuencia puede ser determinado empleando métodos de rutina, por ejemplo, los programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineación local básica) o programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang y Madden,

20 Genome Res., 1997, 7, 649-656); o mediante el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), usando los parámetros por defecto, que utiliza el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489).

En algunas formas de realización, se proporcionan en esta solicitud

25 oligonucleótidos antisentido que comprenden una secuencia de nucleobases que tiene por lo menos 70% (por ejemplo, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o

100%) de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias de nucleobases proporcionadas en cualquiera de las Tablas 2–17, donde C de cualquiera de las secuencias de nucleobases es o bien citosina o 5–metilcitosina, y donde por lo menos un nucleótido del oligonucleótido tiene una modificación 2'. En algunas formas de realización, se proporcionan en esta solicitud oligonucleótidos antisentido que comprenden una secuencia de nucleobases que tiene por lo menos 90% (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias de nucleobases proporcionadas en cualquiera de las Tablas 2–17. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT comprenden cualquiera de las secuencias de nucleobases proporcionadas en cualquiera de las Tablas 2–17. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT consisten en cualquiera de las secuencias de nucleobases proporcionadas en cualquiera de las Tablas 2–17.

En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se proporcionan en esta solicitud son de 12 a 30 nucleobases de longitud. Por ejemplo, un oligonucleótido antisentido que se dirige a MAPT puede comprender 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleobases. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT son de 12 a 25 nucleobases de longitud. Por ejemplo, un oligonucleótido antisentido que se dirige a MAPT puede comprender 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleobases. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT son de 15 a 20 nucleobases de longitud. Por ejemplo, un oligonucleótido antisentido que se dirige a MAPT puede comprender 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT comprenden 17 nucleobases. Es posible aumentar o disminuir la longitud de un oligonucleótido

antisentido, y/o introducir bases de apareamiento erróneo (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 apareamientos erróneos) en un oligonucleótido antisentido, sin eliminar su actividad.

Modificación química de oligonucleótidos antisentido

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

Los oligonucleótidos antisentido proporcionados en este documento pueden contener una o más subunidades de nucleótidos y/o uniones de internucleósidos
15 modificados. Las modificaciones químicas en oligonucleótidos abarcan cambios en uniones de internucleósidos, restos de azúcar, nucleobases y/o espinazos. Las modificaciones pueden mejorar la estabilidad, eficacia y/o reducir la inmunogenicidad de los oligonucleótidos antisentido. Por ejemplo, los oligonucleótidos se pueden modificar para que tengan una resistencia
20 incrementada a las nucleasas, una afinidad de unión mejorada para el objetivo de ácido nucleico, una captación celular mejorada y/o una actividad inhibidora incrementada, en comparación con los oligonucleótidos no modificados

En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en la presente solicitud incluyen uniones internucleosídicas de
25 fosfodiéster de origen natural. Las uniones de fosfodiéster pueden modificarse en otras uniones que contienen fósforo, tales como uniones de fosforotioato, fosfotriéster, metilfosfonato o fosforamidato, o uniones que no contienen fósforo. En

algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en este documento incluyen una o más uniones internucleosídicas modificadas. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en este documento incluyen uniones fosforotioato. En algunas formas de realización, cada unión de internucleósido de un oligonucleótido antisentido es una unión de internucleósido de fosforotioato

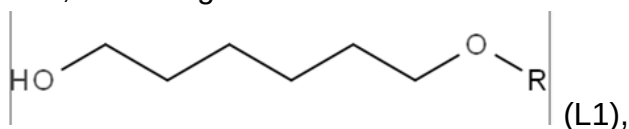
En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en este documento incluyen restos de azúcar químicamente modificados. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido pueden incluir una modificación 2' en el anillo de furanosa, puentes de átomos de anillo no geminales para formar ácidos nucleicos bicíclicos (BNA, conforme a sus siglas en inglés), reemplazado del átomo de oxígeno del anillo de azúcar por otros átomos, o sus combinaciones. En algunas formas de realización, cada nucleótido de un oligonucleótido antisentido tiene un anillo de furanosa 2'-modificado. La modificación 2' ejemplar incluye 2'-fluoro, 2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropilo (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetilo (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropilo (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetilaminoetiloxietilo (2'-O-DMAEOE) y 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA). En algunas formas de realización, cada nucleótido de un oligonucleótido antisentido tiene una modificación 2'-O-MOE en el resto de azúcar.

En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en la presente pueden incluir la sustitución de un nucleótido en una posición determinada, con una versión modificada del mismo nucleótido. Por ejemplo, un nucleótido (A, G, C o T) puede ser reemplazado por la correspondiente hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-

metilguanina, beta-D-manosilqueosina, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, wibutoxosina, queosina, 2-tiocitosina o 2,6-diaminopurina.

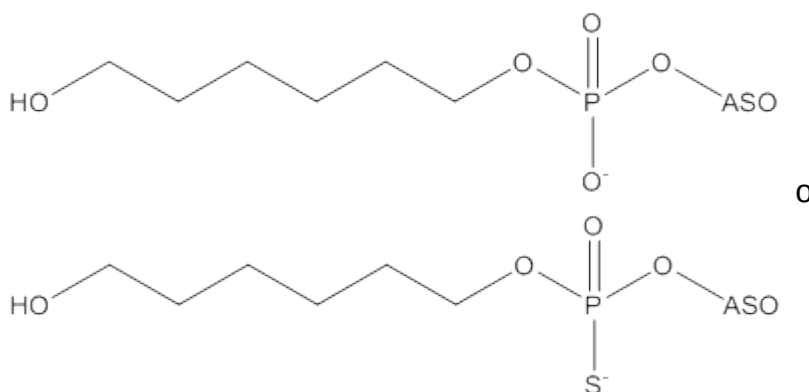
En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados aquí incluyen oligonucleótidos modificados químicamente que reducen la inmunogenicidad de oligonucleótidos. Por ejemplo, se ha demostrado que los oligonucleótidos que contienen modificaciones de 5-metilcitosina o 2'-O-MOE exhiben una estimulación inmunitaria disminuida en ratones (Henry S. y col., J Pharmacol Exp Ther. 2000 Feb; 292 (2): 468-79). En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados aquí incluyen 5-metilcitosinas en lugar de citosinas. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en este documento incluyen modificaciones 2'-O-MOE. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en este documento incluyen 5-metilcitosinas y modificaciones 2'MOE.

En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT proporcionados en este documento incluyen un enlazador C6 en el extremo 3', con la siguiente estructura:



que está unido al extremo 3' del oligonucleótido mediante un puente de fosfato, donde R = PO₂-O-oligonucleótido (para uniones de internucleósido de fosfodiéster) o R = POS-O-oligonucleótido (para uniones de internucleósido de fosforotioato). Dicho enlazador C6 3' puede bloquear el ataque de 3'-exonucleasa y, por lo tanto, mejorar la estabilidad y duración del efecto de los oligonucleótidos antisentido (ver WO 2005/021749 para estrategia similar aplicada a ARNsiA). En algunos casos, el enlazador C6 3' puede además facilitar la síntesis y/o la purificación de los oligonucleótidos antisentido. En algunas formas de realización,

los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT pueden tener cualquiera de las siguientes estructuras:



5

En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se proporcionan en esta solicitud pueden incluir un espinazo alternativo, por ejemplo, morfolino, ácido nucleico bloqueado (LNA, conforme a sus siglas en inglés), ácido nucleico desbloqueado (UNA, conforme a sus siglas en inglés), ácido nucleico treósico (TNA, conforme a sus siglas en inglés), ácido nucleico glicólico (GNA, conforme a sus siglas en inglés), y/o ácido nucleico peptídico (PNA, conforme a sus siglas en inglés). En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se proporcionan en esta solicitud pueden incluir nucleósido bicíclico (BNA, conforme a sus siglas en inglés) que comprende un puente que conecta dos átomos de carbono del anillo de azúcar. Por ejemplo, dicho BNA puede incluir “etilo limitado” (o “cEt”), que comprende un puente 4′-CH(CH₃)-O-2′ que conecta el 4′-carbono y el 2′-carbono del resto azúcar. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se proporcionan en esta solicitud pueden incluir ácido nucleico bloqueado (LNA) que comprende un puente que conecta dos átomos de carbono entre las posiciones 4′ y 2′ de la unidad de azúcar del nucleósido. Dicho LNA puede incluir α-L-metilenoxi (4′-CH₂-O-2′) LNA, β-D-metilenoxi (4′-CH₂-O-2′) LNA, etilenoxi (4′-(CH₂)₂-O-2′) LNA, aminooxi (4′-CH₂-O-N(R)-2′) LNA, oxiamino (4′-CH₂-N(R)-O-2′) LNA o cualquier otro LNA descrito en las Patentes de los Estados Unidos Nros. 7.053.207; 6.268.490; 6.770.748; 6.794.499;

20

7.034.133; 6.525.191; 7.696.345; 7.569.575; 7.314.923; 7.217.805; 7.084.125; o 6.670.461; Publicaciones de Patente Nros. WO 98/39352 o WO 99/14226. Otros LNA adecuados incluyen los LNA descritos en las referencias de Braasch et al., Chern. Biol. 8: 1–7, 2001; Elayadi et al., Curr. Opin. Opin. Inven. Drugs 2: 558–561, 2001; Frieden et al., Nucleic Acids Research, 21: 6365–6372, 2003; Koshkin et al., Tetrahedron, 54: 3607–3630, 1998; Morita et al., Bioorganic Medicinal Chemistry, 11: 2211–2226, 2003; Orum et al., Curr. Opin. Mol. Ther. 3: 239–243, 2001; Singh et al., Chem. Commun. 4: 455–456, 1998; Singh et al., J. Org. Chem., 63: 10035–10039, 1998; o Wahlestedt et al., PNAS 97: 5633–5638, 2000.

10 Bloqueadores estéricos.

Un oligonucleótido antisentido puede unirse a un ácido nucleico objetivo y bloquear estéricamente el acceso de proteínas de unión a ADN o ARN, factores de transcripción, factores de empalme, ribosoma y/o maquinaria de traducción al ácido nucleico objetivo, y así disminuir la expresión objetivo, sin activar ARNasa H. Por ejemplo, dichos bloqueadores estéricos pueden reducir la expresión de una proteína objetivo hibridando con secuencias que rodean el codón de inicio del objetivo, bloqueando secuencias puntuales de ramificación intrónicas, dirigiendo a sitios de corte y empalme, delimitando secuencias intrónicas y/o exónicas o dirigiendo a secuencias reguladoras tales como mejoradores de corte y empalme de exones. Los bloqueadores estéricos pueden diseñarse sobre la base de los límites del intrón–exón y la estructura de gen previamente determinados o previstos, y se puede generar un panel de diferentes oligonucleótidos antisentido para bloquear el mismo sitio. Se pueden realizar análisis BLAST para cada ASO a fin de minimizar la hibridación fuera del objetivo.

25 Los bloqueadores estéricos pueden lograr la reducción del ARNm explotando las vías de vigilancia celular endógenas que reconocen y degradan los ARNm aberrantes. Una de estas vías es la desintegración de ARNm mediada por

el no sentido (NMD, conforme a sus siglas en inglés), que modula la expresión génica y evita la producción de proteínas potencialmente tóxicas a partir de ARNm. Los defectos en el procesamiento de pre-ARNm pueden dar lugar a la pérdida de función de la proteína cuando se introduce un codón de terminación prematura (PTC, conforme a sus siglas en inglés) e interrumpe el marco de lectura abierto. Dicho ARNm que contiene PTC puede ser un sustrato para NMD, que implica la comunicación entre el ribosoma de traducción y componentes del complejo de unión de exón, que incluyen el factor de NMD esencial UPF1, para degradar el ARN por actividad de endonucleasa y exonucleasa. Los ASO pueden diseñarse racionalmente para provocar la reducción del ARNm objetivo dirigiendo el ARNm objetivo a la vía de NMD. Esto se puede lograr diseñando las secuencias de bloqueadores estéricos para que sean complementarias a los exones de codificación específicos, uniones intrón-exón u otras secuencias necesarias para un procesamiento de pre-ARNm adecuado, a fin de introducir omisión de exón, desplazamiento de marco y/o introducción de PTC.

En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT proporcionados en este documento son bloqueadores estéricos, por ejemplo, oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleobases que tiene por lo menos 70% (por ejemplo, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83 %, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%) de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias de nucleobases proporcionadas en cualquiera de las Tablas 2–8. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT proporcionados en este documento son bloqueadores estéricos que comprenden cualquiera de las secuencias de nucleobases proporcionadas en cualquiera de las Tablas 2–8. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT proporcionados en este documento son bloqueadores estéricos que consisten en

cualquiera de las secuencias de nucleobases proporcionadas en cualquiera de las Tablas 2–8. Como se detalla en los ejemplos a continuación, los bloqueadores estéricos se diseñaron para dirigirse a los exones constitutivos tau (por ejemplo, exones 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 13), secuencias que delimitan el codón de inicio de MAPT, aceptadores y donantes de empalme, puntos de ramificación de corte y empalme, secuencias relacionadas con la pista de polipirimidina o secuencias mejoradoras o inhibidoras del empalme. El direccionamiento del codón de inicio y el exón 1 potencialmente bloquearía el inicio de la traducción. Los ASO que interfieren con el empalme y/o inducen la omisión de exón darían lugar al desplazamiento de marco y/o la introducción de un codón de detención prematura corriente descendente, lo que conduciría a una reducción del ARNm de MAPT y/o de la proteína tau.

Se pueden incorporar modificaciones químicas en bloqueadores estéricos para mejorar su estabilidad, eficacia y/o captación celular. Los bloqueadores estéricos pueden tener una modificación química en cada posición de nucleótido o en algunas posiciones seleccionadas. Por ejemplo, la incorporación de 2'–modificación del anillo de azúcar (como 2'–O–metoxietilo, MOE), inclusión de ácido nucleico bloqueado (LNA) y/o modificaciones de espinazo (como fosforotioato) pueden disminuir la degradación de nucleasa y/o aumentar la afinidad de unión de los oligonucleótidos antisentido. Además de las modificaciones de azúcar y/o espinazo, los bloqueadores estéricos pueden prepararse a partir de oligómeros que son bastante diferentes de ADN o ARN. El ácido nucleico peptídico (PNA) es un imitador de oligonucleótido cuyas nucleobases están unidas por enlaces de amida. Debido a que el espinazo de amida no está cargado, la unión se caracteriza por altas tasas de asociación y alta afinidad (véase Bentin T, *Biochemistry* 1996; 35: 8863–8699; Smulevitch SV, *Nat Biotech.* 1996; 14: 1700–1704). Los oligómeros de morfolino fosfordiamidato (comúnmente denominados PMO o "morfolinos") son

otro análogo de ADN sin carga. Los PMO no se unen a objetivos complementarios con las altas afinidades que caracterizan la unión a PNA, pero han demostrado ser agentes eficaces dentro de las células (véase Summerton J, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1997; 7:187–195; Corey DR, Genome Biol. 2001; 2: REVIEWS1015).

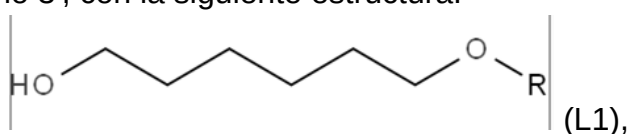
5 En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT proporcionados en este documento son bloqueadores estéricos que comprenden nucleótidos 2'-modificados. La modificación 2' puede seleccionarse del grupo que consiste en 2'-fluoro, 2'-deoxi-2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropilo (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetilo
10 (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropilo (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetilaminoetiloxietilo (2'-O-DMAEOE) y 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA). En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT proporcionados en este documento son bloqueadores estéricos que tienen modificación 2'-O-MOE en cada subunidad de nucleótido.

15 En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT proporcionados en este documento son bloqueadores estéricos que tienen uniones de fosfodiéster o fosforotioato de internucleósido.

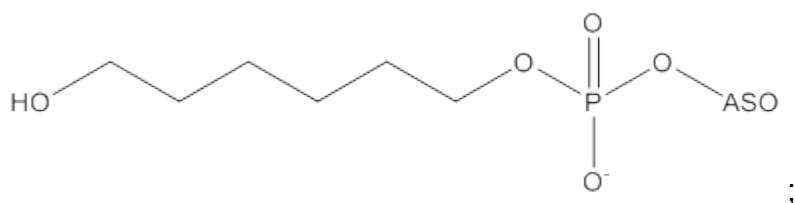
 En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT proporcionados en este documento son bloqueadores estéricos que
20 contienen modificaciones de espinazo que impiden la unión a ARNasa H. Tales bloqueadores estéricos pueden incluir uniones de internucleósido modificadas, por ejemplo, unión de fosfonato de metilo, unión de fosfonotioato de metilo, unión de fosforomorfolidato, unión de fosforopiperazidato o unión de fosforamidita. En algunas formas de realización, una unión de internucleósido por medio puede
25 contener un fosfato modificado con un resto alquilo inferior 2' (por ejemplo, alquilo C1–C4, lineal o ramificado, saturado o insaturado, tal como metilo, etilo, etenilo, propilo, 1-propenilo, 2-propenilo e isopropilo) o una combinación de los mismos.

En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT proporcionados en este documento son bloqueadores estéricos que incluyen una o más uniones de internucleósido modificadas descritas en la Patente de los Estados Unidos Nro. 5.149.797.

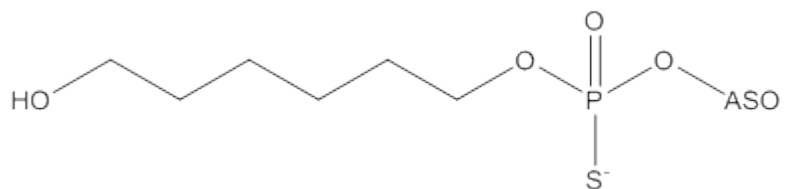
- 5 En algunas formas de realización, los bloqueadores estéricos que se dirigen a MAPT que se proporcionan en esta solicitud incluyen un enlazador C6 en el extremo 3', con la siguiente estructura:



- que está unido al extremo 3' del oligonucleótido mediante un puente de
10 fosfato, donde R = PO₂-O-oligonucleótido (para uniones de internucleósido de fosfodiéster) o R = POS-O-oligonucleótido (para uniones de internucleósido de fosforotioato). Por consiguiente, los bloqueadores estéricos que se dirigen a MAPT con uniones de internucleósido de fosfodiéster pueden tener la siguiente estructura:



- 15 y los bloqueadores estéricos que se dirigen a MAPT con uniones de internucleósido de fosforotioato pueden tener la siguiente estructura:



- 20 **Gápmeros.**

Los oligonucleótidos antisentido que comprenden un tramo contiguo de ADN pueden reclutar endonucleasa ARNasa H celular para la heterodupla ARN:ADN

objetivo y escindir el ARN objetivo en la dupla de ARN:ADN. Los gápmeros son compuestos quiméricos antisentido. Los compuestos antisentido quiméricos contienen típicamente por lo menos una región modificada para conferir resistencia incrementada a la degradación de nucleasas, aumento de la captación celular, 5 afinidad de unión aumentada para el ácido nucleico objetivo y/o actividad inhibidora incrementada, y una segunda región que tiene nucleótidos que son químicamente diferentes de los nucleótidos de la primera región.

Los gápmeros tienen un segmento de brecha gap central que consiste en un tramo de 2'-desoxirribonucleótidos contiguos, situados entre dos segmentos de ala 10 que consisten en nucleótidos modificados en los extremos 5' y 3'. El segmento gap de brecha sirve como el sustrato para la escisión de endonucleasa ARNasa H, mientras que los segmentos de ala con nucleótidos modificados confieren una mayor resistencia a la degradación de otras nucleasas. El segmento de ala-gap-ala se puede describir como "X-Y-Z", donde "X" representa la longitud del ala 5', 15 "Y" representa la longitud de la brecha, y "Z" representa la longitud del ala 3'. "X" y "Z" pueden comprender restos de azúcar uniformes, variantes o alternantes.

En algunas formas de realización, el segmento de brecha central de un gápmero consiste en por lo menos cinco (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) 2'-desoxirribonucleótidos contiguos; y los segmentos de ala 5' y 3' comprenden uno o 20 más nucleótidos modificados 2'. Se ha informado que un oligonucleótido quimérico que comprende un tramo de hasta cuatro 2'-desoxirribonucleótidos contiguos no activa la ARNasa H. Véase la Patente de los Estados Unidos Nro. 9.157.081. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT proporcionados en este documento son gápmeros que comprenden por lo menos 25 siete (por ejemplo, 7, 8, 9, 10, 11, 12) 2'-desoxirribonucleótidos contiguos. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT proporcionados en este documento son gápmeros que comprenden diez 2'-

desoxirribonucleótidos contiguos. La modificación 2' puede seleccionarse del grupo que consiste en 2'-fluoro, 2'-deoxi-2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropilo (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetilo (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropilo (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetilaminoetiloxietilo (2'-O-DMAEOE) y 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA).

En algunas formas de realización, los gápmers que se dirigen a MAPT son gápmers 5-10-5 que tienen 20 nucleósidos de longitud, en los que el segmento de brecha central comprende diez 2'-desoxinucleósidos y está flanqueado por segmentos de ala 5' y 3' que comprenden, cada uno, cinco nucleósidos cada uno con una modificación 2'. Otros gápmers adecuados incluyen, sin limitación, gápmers 5-9-5, gápmers 5-8-5, gápmers 4-8-6, gápmers 6-8-4 o gápmers 5-7-6.

En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT proporcionados en este documento son gápmers, por ejemplo, oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleobases que tiene por lo menos 70% (por ejemplo, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de nucleobases proporcionadas en cualquiera de las Tablas 9-15 y 17. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT proporcionados en este documento son gápmers que comprenden cualquiera de las secuencias de nucleobases proporcionadas en cualquiera de las Tablas 9-15 y 17. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT proporcionados en este documento son gápmers que consisten en cualquiera de las secuencias de nucleobases proporcionadas en cualquiera de las Tablas 9-15 y 17. Como se detalla en los ejemplos a continuación, los gápmers se diseñaron para dirigirse a secuencias que rodean el codón de inicio, el exón 1 o la región 3'

no traducida (UTR) de la transcripción de MAPT. En algunas formas de realización, los gápmers se diseñaron para dirigirse a 3' UTR.

En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT proporcionados en este documento son gápmers 5–10–5 que comprenden cualquiera de las secuencias de nucleobases proporcionadas en cualquiera de las Tablas 9–15 y 17, donde los nucleótidos primero a quinto comprenden cada uno un nucleósido 2'–O–MOE modificado, donde los nucleótidos sexto a decimoquinto comprenden cada uno un 2'–desoxinucleósido, y donde los nucleótidos decimosexto a vigésimo comprenden cada uno un nucleósido 2'–O–MOE modificado.

Secuencias genómicas de MAPT dirigidas por oligonucleótidos antisentido.

En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido se diseñan para dirigirse a una región particular de la secuencia genómica de MAPT (Nro. de acceso de GenBank NG_007398.1; SEQ ID NRO.: 304) o una región del ARNm o transcripción de tau correspondiente (SEQ ID NRO.: 306). Las secuencias de intrón y exón de MAPT y puntos de ramificación se determinaron sobre la base del sitio web de la base de datos de genomas Ensembl usando Transcript: MAPT–203 ENST00000344290. El cribado de exones, intrones y uniones intrón/exón del gen MAPT humano reveló que dirigirse a algunas regiones en el gen MAPT o la transcripción mediante oligonucleótidos antisentido es más eficaz para reducir la expresión de tau que dirigirse a otras regiones. Por ejemplo, la Tabla 1 enumera las secuencias de algunas regiones preferidas en el gen o la transcripción de MAPT que pueden ser dirigidas por oligonucleótidos antisentido.

En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en este documento comprenden una secuencia de nucleobases que es complementaria a por lo menos 12 nucleobases contiguas (por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 nucleobases contiguas) de cualquiera de SEQ ID NOs: 487–

506, con 1, 2 o 3 apareamientos erróneos. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en este documento comprenden una secuencia de nucleobases que es 100% complementaria a por lo menos 12 nucleobases contiguas (por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 nucleobases contiguas) de cualquiera de las SEQ ID NOs : 487–506.

Tabla 1: secuencias genómicas, de ARNm o preARNm de MAPT seleccionadas dirigidas por oligonucleótidos antisentido de tau.

Secuencias genómicas MAPT seleccionadas (hebra antisentido) dirigidas por ASO tau	SEQ ID NO	Ubicación	Correspondiente secuencia ARNm o pre-ARNm MAPT dirigida por ASO tau
ACGCTGGCCTGAAAGGTTAGTGGAC	292	Unión intrón/exón 1	GUCCACUAACCUUUCAGGCCA GCGU (SEQ ID NO: 503)
AAAAGCCAAGGTAAGCTGACGATGC	293	Unión intrón/exón 5	GCAUCGUCAGCUUACCUUG GCUUUU (SEQ ID NO: 504)
TTTTATATTTTATCAGCTCGCATGG	294	Unión intrón/exón 5	CCAUGCGAGCUGAUAAAAUUA AAAA (SEQ ID NO: 505)
ACCCACAAGCTGACCTTCCG	295	Exón 13	CGGAAGGUCAGCUUGUGGGU (SEQ ID NO: 487)
ACCAGCTGAAGAAGCAGGCATTG GAGACAC	296	Exón 4	GUGUCUCCAAUGCCUGCUUCU UCAGCUGGU (SEQ ID NO: 488)
CTCTCATCTCCAGGTGCAAATAGTC	297	Unión intrón/exón 11	GACUAUUUGCACCUGGAGAUG AGAG (SEQ ID NO: 506)
ATAGTCTACAAACCAGTTGA	298	Exón 11	UCAACUGGUUUGUAGACUAU (SEQ ID NO: 489)
ATTAGGCAACATCCATCATA	299	Exon 11	UAUGAUGGAUGUUGCCUAAU (SEQ ID NO: 490)
GAACCAGGATGGCTGAGCCC	300	Exón 1	GGGCUCAGCCAUCUGGUUC (SEQ ID NO: 491)
CGTCCCTGGCGGAGGAAA	301	Exón 12	UUUCCUCCGCCAGGGACG (SEQ ID NO: 492)
TGGTCAGTAAAAGCAAAGAC	302	Exón 5	GUCUUUGCUUUUACUGACCA (SEQ ID NO: 493)
CTGGAAGCGATGACAAAAAA	303	Exón 5	UUUUUUGUCAUCGCUUCCAG (SEQ ID NO: 494)
CCTTGCTCAGGTCAACTGGT	479	Exón 12	ACCAGUUGACCUGAGCAAGG (SEQ ID NO: 495)
GGTTGACATCGTCTGCCTGT	480	3'UTR	ACAGGCAGACGAUGUCAACC (SEQ ID NO: 496)
GTCCCACTCTTGTGCCTGGA	481	3'UTR	UCCAGGCACAAGAGUGGGAC (SEQ ID NO: 497)
GACATCGTCTGCCTGTGGCT	482	3'UTR	AGCCACAGGCAGACGAUGUC (SEQ ID NO: 498)
CCCACTCTTGTGCCTGGACT	483	3'UTR	AGUCCAGGCACAAGAGUGGG (SEQ ID NO: 499)
GTCCCAGGTCTGCAAAGTGG	484	3'UTR	CCACUUUGCAGACCUGGGAC (SEQ ID NO: 500)
GTCTGCCTGTGGCTCCACGA	485	3'UTR	UCGUGGAGCCACAGGCAGAC

			(SEQ ID NO: 501)
AGTCACTCTGGTGAATCCAA	486	3'UTR	UUGGAUUCACCAGAGUGACU (SEQ ID NO: 502)

Conjugados de oligonucleótidos antisentido.

La conjugación de oligonucleótidos antisentido con otro resto puede mejorar la actividad, la captación celular y/o la distribución tisular de los oligonucleótidos antisentido. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido se pueden unir covalentemente a uno o más compuestos de diagnóstico, grupos reporteros, agente de entrecruzamiento, resto que confiere resistencia a nucleasa, molécula lipófila, colesterol, lípido, lectina, enlazador, esteroide, uvaol, hecigenina, diosgenina, terpeno, triterpeno, sarsasapogenina, Friedelin, ácido litocólico derivado de epifriedelanol, vitamina, biotina, carbohidrato, dextrano, tinte, pululano, quitina, quitosano, carbohidrato sintético, oligo lactato 15 mer, polímero natural, polímero de bajo o medio peso molecular, inulina, ciclodextrina, ácido hialurónico, proteína, agente de unión a proteína, molécula dirigida a integrinas, policatiónico, péptido, poliamina, mimético de péptido, transferrina, cumarinas, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas y/o rodaminas.

En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en este documento están unidos a una molécula enlazadora. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido proporcionados en este documento están unidos a lípido o colesterol. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido están unidos a liposomas neutros (NL) o nanopartículas lipídicas (LNP). Las LNP son sistemas a base de lípidos catiónicos autoensamblados, que pueden comprender, por ejemplo, un lípido neutro (la base liposómica); un lípido catiónico (para carga de oligonucleótido); colesterol (para estabilizar los liposomas); y PEG-lípido (para estabilizar la formulación, proteger contra carga y circulación extendida en el torrente sanguíneo). Los liposomas neutros (NL) son partículas a base de lípidos no catiónicos.

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

10 **Prueba de actividades de oligonucleótidos antisentido.**

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

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

El nivel de ARNm de MAPT puede detectarse y cuantificarse mediante una sonda que hibrida específicamente con un segmento de transcripción de MAPT, por ejemplo, mediante análisis de transferencia Northern. El nivel de ARNm de MAPT también se puede detectar y cuantificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando un par de cebadores que reconocen la transcripción

de MAPT. Los procedimientos generales para PCR se enseñan en MacPherson et al., PCR: A Practical Approach (IRL Press en Oxford University Press (1991)). Sin embargo, las condiciones de PCR utilizadas para cada reacción de aplicación se determinan empíricamente. Una cantidad de parámetros influyen en el éxito de una
5 reacción, por ejemplo, la temperatura y el tiempo de anelación, el tiempo de extensión, la concentración de Mg^{2+} y/o ATP, el pH y la concentración relativa de cebadores, patrones y/o desoxirribonucleótidos. Después de la amplificación, los fragmentos de ADN resultantes se pueden detectar mediante electroforesis en gel de agarosa, seguido de la visualización con tinción con bromuro de etidio e
10 iluminación ultravioleta.

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

Alternativamente, se puede añadir una etiqueta directamente a la muestra de ácido nucleico original (por ejemplo, ARNm, poliA, ARNm, ADNc, etc.) o al producto de amplificación después de que se completa la amplificación. Los expertos en la técnica conocen bien los medios de unión de etiquetas a ácidos
20 nucleicos, que incluyen, por ejemplo, traducción de mellas o etiquetado de extremo (por ejemplo, con un ARN etiquetado) mediante quinaseado [N. de T.: adición de un grupo fosfato usando quinasa de polinucleótido] del ácido nucleico y posterior unión (ligadura) de un enlazador de ácido nucleico que une el ácido nucleico de la muestra a una etiqueta (por ejemplo, un fluoróforo).

25 Las etiquetas detectables adecuadas para usar en la presente invención incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Las

etiquetas útiles en la presente invención incluyen biotina para la tinción con conjugado de estreptavidina etiquetado, perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™), tintes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rojo texas, rodamina, proteína fluorescente verde y similares), radioetiquetas (por ejemplo, 3H, 125I, 35S, 14C o 32P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras comúnmente usadas en un ensayo ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzima, conforme a sus siglas en inglés)), y etiquetas calorimétricas como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico de color (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex , etc.). Las patentes que enseñan el uso de tales etiquetas incluyen las Patentes de los Estados Unidos Nros. 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241.

La detección de etiquetas es bien conocida por los expertos en la técnica. De este modo, por ejemplo, las radioetiquetas pueden detectarse usando una película fotográfica o contadores de centelleo, los marcadores fluorescentes pueden detectarse usando un fotodetector para detectar la luz emitida. Las etiquetas enzimáticas se detectan normalmente proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y las etiquetas calorimétricas se detectan simplemente visualizando la etiqueta coloreada. Para una revisión detallada de los métodos de etiquetado de ácidos nucleicos y detección de ácidos nucleicos hibridados etiquetados, véase Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 24: Hibridación con sondas de ácido nucleico, P. Tijssen, ed. Elsevier, N. Y. (1993).

La actividad de oligonucleótidos antisentido también puede evaluarse midiendo los niveles de proteína tau usando los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el nivel de proteína tau puede cuantificarse mediante análisis de transferencia Western (inmunotransferencia), ensayo inmunosorbente ligado a

enzima (ELISA), inmunohistoquímica, inmunoensayos, inmunoprecipitación, ensayos inmunofluorescentes, inmunocitoquímica, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, conforme a sus siglas en inglés), radioinmunoensayos, ensayos inmunorradiométricos, cromatografía líquida de alto
 5 rendimiento (HPLC, conforme a sus siglas en inglés), espectrometría de masas, microscopia confocal, ensayos enzimáticos o resonancia de plasmón superficial (SPR).

La actividad *in vivo* de los oligonucleótidos antisentido también puede evaluarse en modelos animales. Las pruebas se pueden realizar en animales
 10 normales o en modelos animales de enfermedad experimentales. Los oligonucleótidos antisentido pueden formularse en un diluyente farmacéuticamente aceptable y suministrarse a través de una vía de administración adecuada. Después de un período de tratamiento, se pueden recoger muestras de tejido, por ejemplo, tejido cerebral, líquido cefalorraquídeo (LCR), médula espinal, y se puede
 15 medir el nivel de expresión de tau usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente. Puede efectuarse el análisis histológico para evaluar la estructura cerebral y/o la presencia de ovillos neurofibrilares. Los cambios fenotípicos de los animales tratados, como la mejora de la cognición o la movilidad, también pueden controlarse y evaluarse.

20 **Síntesis y caracterización de oligonucleótidos.**

Los oligonucleótidos monocatenarios se pueden sintetizar usando cualquier método de polimerización de ácidos nucleicos conocido en la técnica, por ejemplo, síntesis en fase sólida empleando metodología de fosforamidita (S. L. Beaucage y R. P. Iyer, Tetrahedron, 1993, 49, 6123; S. L. Beaucage y R. P. Iyer, Tetrahedron,
 25 1992, 48, 2223), H-fosfonato, química de fosfotriéster o síntesis enzimática. Se pueden usar sintetizadores comerciales automatizados, por ejemplo, sintetizadores de BioAutomation (Irving, Texas) o Applied Biosystems (Foster City, California). En

algunas formas de realización, los oligonucleótidos monocatenarios se generan usando química de fosforamidita en fase sólida estándar, tal como se describe en *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, Beaucage, S. L. et al. (Editores), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, USA. Las uniones de fosforotioato se pueden

5 introducir usando un reactivo de sulfuración tal como disulfuro de fenilacetilo o DDTT (((dimetilamino–metilideno)amino)–3H–1,2,4–ditiazaolina–3–tiona). Es bien conocido el uso de técnicas similares y amiditas modificadas y productos de vidrio de poro controlado (CPG, conforme a sus siglas en inglés) disponibles comercialmente, tales como amiditas y/o CPG modificados con biotina,

10 fluoresceína, acridina o psoralina, para sintetizar oligonucleótidos modificados, u oligonucleótidos etiquetados fluorescentemente, con biotina, u otros oligonucleótidos conjugados.

El control de la calidad de los materiales de partida y los productos de cada etapa de síntesis es vital para minimizar los niveles de impurezas en el producto

15 final. Sin embargo, dada la cantidad de pasos de síntesis por acoplamiento y el número de acoplamientos, la presencia de impurezas es inevitable. Los métodos de purificación pueden usarse para excluir las impurezas no deseadas del producto oligonucleotídico final. Las técnicas de purificación utilizadas comúnmente para oligonucleótidos monocatenarios incluyen cromatografía líquida de alto rendimiento

20 de par iónico de fase inversa (RP–IP–HPLC, conforme a sus siglas en inglés), electroforesis en gel capilar (CGE, conforme a sus siglas en inglés), HPLC de intercambio aniónico (AX–HPLC, conforme a sus siglas en inglés) y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, conforme a sus siglas en inglés).

Después de la purificación, los oligonucleótidos pueden analizarse mediante

25 espectrometría de masas y cuantificarse mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm.

Usos terapéuticos y métodos de tratamiento.

Se proporcionan aquí métodos para disminuir el nivel de expresión de tau en un sujeto, por ejemplo, un ser humano, administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los oligonucleótidos antisentido descritos en este documento. En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido se puede administrar al sujeto a través de una vía intratecal, intracraneal, intranasal, intravenosa, oral o subcutánea. En algunas formas de realización, dichos métodos incluyen además la identificación y selección de un sujeto que está afectado con una enfermedad asociada a tau, o es sensible a dicha enfermedad.

Los oligonucleótidos antisentido proporcionados en el presente documento, o sus composiciones farmacéuticas, pueden usarse para tratar o prevenir una enfermedad asociada a tau en un sujeto. En algunas formas de realización, la invención proporciona los oligonucleótidos antisentido como se describe en la presente memoria, o sus composiciones farmacéuticas, para el uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada a tau en un paciente. En formas de realización adicionales, la invención proporciona el uso de los oligonucleótidos antisentido como se describe en este documento en la fabricación de un medicamento para el uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada a tau en un paciente.

Las enfermedades asociadas a tau incluyen, sin limitación, enfermedad de Alzheimer (AD), esclerosis lateral amiotrófica/complejo de parkinsonismo–demencia (ALS–PDC), demencia de grano argirofílica (AGD), angiopatía amiloide de tipo británico, angiopatía amiloide cerebral, encefalopatía traumática crónica (CTE), degeneración corticobasal (CBD, conforme a sus siglas en inglés), enfermedad de Creutzfeldt–Jakob (CJD), demencia pugilística, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, síndrome de Down, síndrome de Dravet, epilepsia, demencia frontotemporal (FTD), demencia frontotemporal con parkinsonismo relacionado con el cromosoma 17 (FTDP–17), degeneración lobular

frontotemporal, ganglioglioma, gangliocitoma, enfermedad de Gerstmann–Straussler–Scheinker, enfermedad de Hallervorden–Spatz, enfermedad de Huntington, miositis por cuerpos de inclusión, encefalopatía por plomo, enfermedad de Lytico–Bodig, meningioangiomatosis, atrofia multisistémica, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann–Pick tipo C (NP–C), enfermedad de neuronas motoras no guameña con ovillos neurofibrilares, enfermedad de Pick (PiD), parkinsonismo posencefalítico, angiopatía amiloide cerebral con proteína priónica, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva (PSP), panencefalitis esclerosante subaguda, demencia solo con ovillos, demencia con ovillo predominante, demencia por infarto múltiple, accidente cerebrovascular isquémico o esclerosis tuberosa.

Terapias de combinación.

Los diversos oligonucleótidos descritos anteriormente pueden usarse en combinación con otros compañeros de tratamiento. Por consiguiente, los métodos para tratar una enfermedad asociada a tau descritos en la presente memoria pueden incluir además la administración de un segundo agente al sujeto que necesita tratamiento. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a la proteína tau asociada a microtúbulos (MAPT) pueden usarse en combinación con un anticuerpo que se une específicamente a la proteína tau y/o un agente dirigido a beta amiloide (A β), por ejemplo, un anticuerpo que se une a A β o inhibidor de beta–secretasa (BACE, conforme a sus siglas en inglés). En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT se usan en combinación con un anticuerpo que se une específicamente a la proteína tau. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT se usan en combinación con un inhibidor de BACE.

El término "combinación" se refiere a una combinación fija en una forma de unidad de dosificación, o una administración combinada donde un compuesto de la

presente invención y un compañero de combinación (por ejemplo, otro fármaco como se explica a continuación, también denominado "agente terapéutico" o "coagente") se pueden administrar en forma independiente al mismo tiempo o por separado en intervalos de tiempo, especialmente cuando estos intervalos de tiempo permiten que los compañeros de combinación muestren un efecto cooperativo, por ejemplo, sinérgico. Los componentes individuales se pueden empaquetar en un equipo o por separado. Uno o ambos componentes (por ejemplo, polvos o líquidos) se pueden reconstituir o diluir a una dosis deseada antes de la administración. Los términos "administración conjunta" o "administración combinada" o similares tal como se utilizan en la presente memoria tienen el propósito de abarcar la administración del compañero de combinación seleccionado a un único sujeto que lo necesita (por ejemplo, un paciente), y están destinados a incluir regímenes de tratamiento en los que los agentes no son necesariamente administrados por la misma vía de administración o al mismo tiempo. El término "combinación farmacéutica" como se usa en el presente documento significa un producto que resulta de la mezcla o combinación de más de un agente terapéutico, e incluye combinaciones tanto fijas como no fijas de los agentes terapéuticos. El término "combinación fija" significa que los agentes terapéuticos, por ejemplo, un oligonucleótido de la presente invención y un compañero de combinación, se administran ambos a un paciente simultáneamente en forma de una única entidad o dosificación. El término "combinación no fija" significa que los agentes terapéuticos, por ejemplo, un oligonucleótido de la presente invención y un compañero de combinación, se administran ambos a un paciente como entidades separadas, o bien de manera simultánea, concurrente o secuencial, sin límites de tiempo específicos, donde dicha administración proporciona niveles terapéuticamente eficaces de los dos compuestos en el organismo del paciente.

Esto último también se aplica a la terapia de cóctel, por ejemplo, la administración de tres o más agentes terapéuticos.

El término "combinación farmacéutica" como se usa en la presente memoria se refiere o bien a una combinación fija en una forma de unidad de dosificación, o
5 combinación no fija o un equipo de partes para la administración combinada, donde dos o más agentes terapéuticos pueden administrarse independientemente al mismo tiempo o por separado dentro de intervalos de tiempo, especialmente cuando estos intervalos de tiempo permiten que los compañeros de combinación muestren un efecto cooperativo, por ejemplo, sinérgico.

10 El término "terapia de combinación" se refiere a la administración de dos o más agentes terapéuticos para tratar una afección o un trastorno terapéutico descrito en la presente divulgación. Tal administración abarca la administración conjunta de estos agentes terapéuticos de una manera sustancialmente simultánea, tal como en una única cápsula que tiene una relación fija de
15 ingredientes activos. Alternativamente, dicha administración abarca la administración conjunta en recipientes múltiples o separados (por ejemplo, comprimidos, cápsulas, polvos y líquidos) para cada ingrediente activo. Los polvos y/o líquidos pueden reconstituirse o diluirse a una dosis deseada antes de la administración. Además, dicha administración también abarca el uso de cada tipo
20 de agente terapéutico de una manera secuencial, o bien aproximadamente al mismo tiempo, o en momentos diferentes. En cualquier caso, el régimen de tratamiento proporcionará efectos beneficiosos de la combinación de fármacos en el tratamiento de las afecciones o de los trastornos descritos en esta solicitud.

Preparación de la muestra.

25 Se pueden obtener muestras de tejido de un sujeto tratado con oligonucleótido antisentido usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante biopsia o cirugía. Por ejemplo, se puede obtener

una muestra que comprende líquido cefalorraquídeo mediante punción lumbar, donde se inserta una aguja fina unida a una jeringa en el canal espinal en el área lumbar, y se crea un vacío tal que el líquido cefalorraquídeo puede succionarse a través de la aguja y ser recogido en la jeringa. La imagen de tomografía computarizada (TC), el ultrasonido o un endoscopio pueden usarse para guiar este tipo de procedimiento.

La muestra puede congelarse instantáneamente y almacenarse a -80°C para su uso posterior. La muestra también se puede fijar con un fijador, como formaldehído, paraformaldehído o ácido acético/etanol. El ARN o la proteína se pueden extraer de una muestra fresca, congelada o fijada, para su análisis.

Composiciones farmacéuticas, dosis y administración.

También se proporcionan en la presente memoria composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, que comprenden uno o más oligonucleótidos antisentido proporcionados en este documento. Las composiciones farmacéuticas incluyen típicamente un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye solución salina, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas se formulan típicamente para que sean compatibles con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración intratecal, intracraneal, intranasal, intravenosa, oral o subcutánea.

En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido descrito en la presente memoria puede conjugarse con un anticuerpo capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (por ejemplo, un anticuerpo que se une al receptor de transferrina, insulina, leptina o factor 1 de crecimiento de tipo insulina) y

administrarse por vía intravenosa (Evers et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 87 (2015): 90–103).

Los métodos para formular composiciones farmacéuticas adecuadas son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 21^a ed., 2005; y los libros de la serie *Drugs and the Pharmaceutical Sciences: a Series of Textbooks and Monographs* (Dekker, NY). Por ejemplo, las soluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica, intratecal o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerol, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable pueden incluir soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles, para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS, conforme a sus siglas en inglés). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista facilidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El portador puede ser

un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de estos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento
5 del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales
10 como manitol, sorbitol, cloruro de sodio, en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

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

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

25 Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usar en forma de

comprimidos, trociscos o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un portador fluido para uso como enjuague bucal. Los agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o los materiales coadyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Los comprimidos, las píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden 5 contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente 10 edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta peperita, salicilato de metilo o saborizante de naranja.

Para la administración por inhalación, los compuestos pueden suministrarse en forma de una pulverización de aerosol desde un recipiente o dosificador presurizado que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como 15 dióxido de carbono, o un nebulizador. Dichos métodos incluyen los descritos en la Patente de los Estados Unidos Nro. 6.468.798. La administración sistémica de un compuesto terapéutico como se describe en este documento también puede ser por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera 20 por penetrar. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal se puede lograr mediante el uso de pulverizaciones nasales o supositorios. Para la 25 administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, savias, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

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

- 5 Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un recipiente, paquete o dosificador, junto con instrucciones para la administración.

En ejemplos no limitativos, la composición farmacéutica que contiene por lo menos un agente farmacéutico se formula como un líquido (por ejemplo, un líquido termoestable), como un componente de un sólido (por ejemplo, un polvo o un

10 polímero biocompatible biodegradable (por ejemplo, un polímero catiónico biodegradable biocompatible), o como un componente de un gel (por ejemplo, un polímero biocompatible biodegradable). En algunas formas de realización, la por lo menos composición que contiene por lo menos un agente farmacéutico se formula como un gel seleccionado del grupo de un gel de alginato (por ejemplo, alginato de

15 sodio), un gel a base de celulosa (por ejemplo, carboximetil celulosa o carboxietil celulosa), o un gel a base de quitosano (por ejemplo, glicerofosfato de quitosano). Ejemplos adicionales, no limitantes, de polímeros liberadores de fármaco que se pueden usar para formular cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria incluyen carragenano, carboximetilcelulosa,

20 hidroxipropilcelulosa, dextrano en combinación con polivinil alcohol, dextrano en combinación con ácido poliacrílico, ácido poligalacturónico, polisacárido galacturónico, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, goma de tamarindo, goma xantano, goma de celulosa, goma de guar (carboximetil guar), pectina, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, N-isopropilpoliacrilamida, polioxietileno,

25 polioxipropileno, ácido plurónico, ácido poliláctico, ciclodextrina, cicloamilosa, resilina, polibutadieno, copolímero de N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HP MA), anhídrido maleico-alquilviniléter, polidepsipéptido, polihidroxibutirato,

policaprolactona, polidioxanona, polietilenglicol, poliorganofosfaceno, poliorto éster, polivinilpirrolidona, ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), polianhídridos, polisilamina, poli N-vinil caprolactama y goma gellan.

En algunas formas de realización, el suministro de oligonucleótido antisentido a un tejido objetivo puede mejorarse mediante el suministro mediado por portador, que incluye, sin limitación, liposomas catiónicos, ciclodextrinas, derivados de porfirina, dendrímeros de cadena ramificada, polímeros de polietilenimina, nanopartículas y microesferas (Dass, C. R. J Pharm Pharmacol 2002; 54 (1): 3 – 27).

Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para obtener resultados beneficiosos o deseados. Por ejemplo, una cantidad terapéutica es aquella que logra el efecto terapéutico deseado. Esta cantidad puede ser la misma o diferente de una cantidad profilácticamente eficaz, que es una cantidad necesaria para prevenir el inicio de la enfermedad o de los síntomas de la enfermedad. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico (es decir, una dosificación eficaz) depende de los compuestos terapéuticos seleccionados. Las composiciones pueden administrarse de una o más veces por día a una o más veces por semana; lo que incluye una vez cada dos días. El experto en la técnica apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación y el tiempo requeridos para tratar eficazmente un sujeto, que incluyen, sin limitación, la gravedad de la enfermedad o del trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos terapéuticos descritos en el presente documento puede incluir un único tratamiento o una serie de tratamientos.

La dosificación, la toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos terapéuticos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población), y la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la relación LD50/ED50. Se prefieren los compuestos que exhiben altos índices terapéuticos. Aunque pueden usarse compuestos que exhiben efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado en diseñar un sistema de suministro que dirija dichos compuestos al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para formular un rango de dosificación para uso en humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferentemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango de acuerdo con la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un rango de concentración en plasma circulante que incluye la IC50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición máxima media de los síntomas) como se determina en cultivo celular. Tal información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido descrito en este documento se disuelve en agua estéril, solución salina (por ejemplo, solución

salina tamponada con fosfato) o líquido cefalorraquídeo (LCR) para la administración. En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido descrito en la presente memoria se administra por vía intratecal, por ejemplo, mediante inyección en bolo en el espacio de disco L3 o L4 o mediante infusión
5 usando una bomba intratecal.

En algunas formas de realización, se administran alrededor de 0,001–1000 mg (por ejemplo, alrededor de 0,1–800 mg, alrededor de 1–600 mg, alrededor de 10–500 mg, alrededor de 50–450 mg, alrededor de 80–300 mg, alrededor de 100–200 mg) del oligonucleótido antisentido descrito en este documento, a un sujeto que
10 lo necesita.

Equipos.

Además se proporcionan equipos que incluyen uno o más oligonucleótidos antisentido descritos anteriormente e instrucciones de uso. Las instrucciones de uso pueden incluir instrucciones para el diagnóstico o tratamiento de una
15 enfermedad asociada a tau. Los equipos como se proporcionan en este documento se pueden usar de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en este documento. Los expertos en la técnica conocerán otros usos adecuados para los equipos proporcionados aquí, y podrán emplear los equipos para tales usos. Los equipos como se proporcionan en este documento también pueden incluir un envío
20 de correo (por ejemplo, un sobre con franqueo pagado o paquete de correo) que se puede usar para devolver la muestra para el análisis, por ejemplo, a un laboratorio. El equipo puede incluir uno o más recipientes para la muestra, o la muestra puede estar en un vial estándar de recolección de sangre. El equipo también puede incluir uno o más de un formulario de consentimiento informado, un formulario de solicitud
25 de prueba e instrucciones sobre cómo usar el equipo en un método descrito en este documento. Los métodos para usar dichos equipos también se incluyen aquí. Uno o más de los formularios (por ejemplo, el formulario de solicitud de prueba) y el

recipiente que contiene la muestra pueden estar codificados, por ejemplo, con un código de barras, para identificar al sujeto que proporcionó la muestra.

El experto en la técnica reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento, que podrían usarse en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no se limita de modo alguno a los métodos y materiales descritos.

EJEMPLOS

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

Ejemplo 1: Materiales y métodos generales.

Síntesis y purificación de los oligonucleótidos antisentido.

Los oligonucleótidos antisentido modificados descritos en esta invención se prepararon usando química de fosforamidita estándar en un sintetizador Mermade192 Synthesizer (BioAutomation) para uso *in vitro*, y en Mermade 12 (BioAutomation), para propósito *in vivo*. Las fosforamiditas se disolvieron en acetonitrilo en una concentración de 0,15 M (0,08 M en Mermade192); el acoplamiento se realizó por activación de fosforamiditas mediante una solución 0,5 M de 5-etiltiotetrazol en acetonitrilo (0,25 M en Mermade192). El tiempo de acoplamiento usualmente fue entre 3–4 minutos. La sulfuración se realizó usando una solución 0,2 M de disulfuro de fenilacetilo durante cinco minutos. La oxidación se realizó mediante una solución de yodo 0,02 M en piridina (20%)/agua (9,5%)/tetrahidrofurano (70,5%), durante dos minutos. Se realizó una cobertura utilizando reactivos de cobertura estándares. Las cadenas de crecimiento de oligonucleótidos se destritaron para el siguiente acoplamiento con ácido dicloroacético al 3% en tolueno. Una vez completadas las secuencias, los compuestos unidos a soporte se escindieron y se desprotegieron mediante hidróxido de amonio líquido a 65°C durante 2 horas. Las soluciones brutas

obtenidas se purificaron directamente por HPLC (Akta Explorer). Las fracciones purificadas se analizaron por espectrometría de masas y se cuantificaron por UV de acuerdo con su coeficiente de extinción a 260 nM. Las fracciones reunidas se desalinizaron y liofilizaron hasta sequedad.

5 Prueba *in vitro* de los oligonucleótidos antisentido.

Los oligonucleótidos antisentido se ensayaron *in vitro* en diversas líneas celulares, que incluyen, sin limitación, líneas celulares humanas tales como células Huh7, células Hela y células SH–SY5Y, y líneas celulares de mono verde COS1. Las células se obtuvieron de proveedores comerciales (por ejemplo, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA), y se cultivaron de acuerdo con las instrucciones de los proveedores.

Los oligonucleótidos antisentido también se ensayaron en neuronas humanas derivadas de células madre embrionarias humanas (hESC, conforme a sus siglas en inglés) que se obtuvieron de WiCell Research Institute, Inc., ubicado en Madison, Wisconsin, EE. UU. Las hESC se convirtieron en células neuronales funcionales por expresión forzada de neurogenina–2 (Ngn2), un factor de transcripción específico de linaje neuronal. La construcción Ngn2 se suministró a hESC utilizando el suministro lentiviral para la expresión constitutiva de rtTA y la expresión inducible por tetraciclina de proteínas exógenas dirigida por un promotor de tetO. Las muestras cumplen con las Pautas para la Investigación de Células Madre Embrionarias Humanas establecidas por el Instituto del Consejo Nacional de Medicina de las Academias Nacionales (National Council Institute of Medicine of the National Academies) ("Pautas NAS"), y las regulaciones de la Oficina de Protecciones de Investigaciones Humanas, Departamento de Salud y Servicios Humanos (Office for Human Research Protections, Department of Health and Human Services) ("DHHS"), para la protección de sujetos humanos (45 CFR Parte 1Q).

Los oligonucleótidos antisentido se introdujeron en células cultivadas mediante transfección o nucleofección, cuando las células alcanzaron aproximadamente 60–80% de confluencia en cultivo. Para la transfección, los oligonucleótidos antisentido se mezclaron con reactivo de transfección OptiFect™ Transfection Reagent (Life Tech Cat # 12579–017) en el medio de cultivo celular apropiado para lograr la concentración de oligonucleótido antisentido deseada y una concentración OptiFect™ que varía de 2 a 12 $\mu\text{g/ml}$ por 100 nM oligonucleótido antisentido. Para la nucleofección, los oligonucleótidos antisentido se introdujeron en células de neuroblastoma SH–SY5Y con el dispositivo Amaxa Nucleofector–II (Lonza, Walkersville, MD). Para probar la eficacia de ASO, la nucleofección se llevó a cabo en placas de 96 pocillos. La solución de nucleofector SF se seleccionó sobre la base de la alta viabilidad y la transfección eficiente después de experimentos preliminares. El día de la nucleofección, se tripsinizaron cultivos confluentes 60–80%, y se colocaron células en cada pocillo. Las neuronas humanas derivadas de hESC se trataron añadiendo 1 o 10 μM de oligonucleótidos antisentido en el medio para su captación pasiva.

Las células se recogieron 24–72 horas después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido, momento en el que el ARNm o la proteína tau se aislaron y se midieron usando métodos conocidos en la técnica y tal como se describe en la presente memoria. En general, cuando los tratamientos se realizaron en múltiples repeticiones, los datos se presentaron como el promedio de los tratamientos de repetición. La concentración de oligonucleótido antisentido usada varió de línea celular a línea celular. Los métodos para determinar la concentración óptima de oligonucleótido antisentido para una línea celular particular son bien conocidos en la técnica. Los oligonucleótidos antisentido se usaron típicamente en concentraciones que variaron de 1 nM a 1000 nM cuando se transfectaron con

OptiFect; y en concentraciones que variaron de 25 nM a 20.000 nM, cuando se transfectaron utilizando nucleofección.

La cuantificación del nivel de ARNm de MAPT (tau) se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando el sistema de PCR en tiempo real ViiA7 (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Antes de la PCR en tiempo real, el ARN aislado se sometió a una reacción de transcripción inversa, que produjo ADN complementario (ADNc) que luego se utilizó como sustrato para la amplificación por PCR en tiempo real. La transcripción inversa y las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron secuencialmente en los mismos pocillos de muestra. Se utilizó el equipo Fastlane cell multiplex kit (Qiagen Cat. # 216513) para lisar células en el pocillo y transcribir en forma inversa los ARNm en ADNc directamente de células cultivadas sin purificación de ARN. Los ADNc se usaron luego para el análisis de la expresión de tau usando PCR cuantitativa en tiempo real. Los niveles de ARNm de tau determinados por PCR en tiempo real se normalizaron utilizando el nivel de expresión de un gen *housekeeping* cuyo nivel de expresión es constante en células, tal como gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa humana (GAPDH, conforme a sus siglas en inglés), proteína de unión de caja TATA humana (TBP) o hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa humana (HPRT1).

Los ensayos de expresión génica TaqMan se realizaron para RT-PCR cuantitativa en tiempo real, siguiendo el protocolo como se describe en el equipo QuantiTect Multiplex RT-PCR Kit (Qiagen Cat. # 204643) usando una reacción de RT-PCR en dupla. Se usaron sondas Taqman específicas para MAPT humana (LifeTech AssayID # Hs00902194_m1: FAM-MGB), GAPDH humana (LifeTech AssayID # Hs02758991_g1: VIC-MGB), TBP humana (LifeTech Cat # 4326322E) o HPRT1 humana (LifeTech Cat # 4333768T). Las muestras se ejecutaron en el sistema de PCR en tiempo real ViiA7 (Life Technologies) siguiendo las condiciones

de ciclado recomendadas para la RT–PCR en dupla. Todos los datos se controlaron para establecer la cantidad de entrada de ADNc, y los niveles de ARNm de tau se normalizaron a los niveles del gen de referencia endógeno. Tau y el gen de control se amplificaron en la misma reacción, con altas eficacias de PCR similares, lo que

5 permitió la cuantificación relativa mediante el método $\Delta\Delta CT$. Los resultados se presentaron como porcentaje de ARNm de tau residual en relación con las células de control tratadas con PBS.

Ensayo *in vivo* de los oligonucleótidos antisentido.

Los oligonucleótidos antisentido para MAPT se ensayaron *in vivo* mediante

10 el suministro de los ASO al líquido cefalorraquídeo (LCR) de ratones a través de la administración ventricular intracerebral (ICV). Los ratones se anestesiaron con isoflurano al 5%, después de lo cual el contenido de isoflurano en oxígeno/oxígeno

nitroso se redujo a 1,5–2% para el mantenimiento durante todo el procedimiento quirúrgico. La temperatura rectal se mantuvo a $36,9 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ con manto de

15 calentamiento homeotérmico y sonda rectal. Se colocaron los ratones anestesiados en un aparato estereotáxico, y se rasuró la piel de la cabeza, que se desinfectó con solución de povidona yodada (Betadine). Antes de la incisión, a los ratones se les administró buprenorfina (Temgesic, 0,03 mg/kg, 1 ml/kg, s. c.). A continuación, se

realizó una incisión para exponer el cráneo para la determinación de las

20 coordenadas cerebrales para la inyección. La inyección (volumen total 2 μl) se suministró utilizando una jeringa Hamilton de 10 μl y aguja de calibre 28 con microbomba (Harvard Apparatus) en el ventrículo lateral derecho para todos los

animales, en las siguientes coordenadas: AP = +0,5 mm; ML = +1,0 mm; DV = –2,5 mm. El caudal fue de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, y la aguja se dejó en su sitio durante 1 minuto

25 después de la infusión antes de extraerla. Se cerró la piel, y se permitió que los ratones se recuperaran en jaulas individuales antes de devolverlos a la jaula de

mantenimiento. Se administraron dosis adicionales de buprenorfina (Temgesic, 0,03 mg/kg, 1 ml/kg, s. c.) dos veces al día durante las primeras 48 horas.

Los animales fueron monitorizados diariamente por técnicos de laboratorio/animales. Se monitorizaron el estado general de los animales y la recuperación de la herida; y el peso corporal se midió diariamente. En el punto final, los animales fueron profundamente anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg Mebunat, Orion Pharma, Finlandia). Los ratones se sometieron a punción de la cisterna magna, y se recogió LCR (3–5 µl por ratón). A continuación, los ratones se sometieron a punción cardíaca, y se recogieron muestras de sangre. Se recogieron aproximadamente 0,4–0,5 ml de sangre en tubos anticoagulantes K2EDTA de lavanda de plástico de 500 µl, se centrifugaron a 2000 g durante 10 min a 4°C, y el plasma se dividió en alícuotas. Posteriormente, los ratones fueron decapitados, y los cerebros se recogieron y se disecaron en diferentes regiones cerebrales, tales como la corteza, el hipocampo y el cerebelo. Además, también se recolectaron las médulas espinales.

Ejemplo 2: Inhibición de la expresión de Tau humana en células Huh7 mediante bloqueadores estéricos de 18 mer 2'-O-MOE.

Los bloqueadores estéricos de oligonucleótidos antisentido se diseñaron para dirigirse a las uniones intrón–exón de los exones constitutivos en Tau humana, los exones invariables presentes en todas las isoformas. Los bloqueadores estéricos de oligonucleótidos antisentido se diseñaron para inducir la omisión de exón, o bien hibridando con secuencias de puntos de ramificación intrónicas, dirigiendo los sitios de corte y empalme directamente, delimitando secuencias intrónicas y exónicas, empalmando en exón sitios mejoradores. Los bloqueadores estéricos dirigidos a MAPT se diseñaron inicialmente como 18 nucleósidos de longitud con modificaciones de azúcar ribosa 2'-O-(2-metoxietilo) (2'-O-MOE) en todos los nucleósidos, que actúan a través del impedimento estérico y no activan la

ARNasa H o RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN, conforme a sus siglas en inglés). Las uniones de internucleósido en su totalidad son uniones de fosfodiéster. Se llevó a cabo una detección imparcial para los ASO de 18 mer uniformemente modificados 2'-MOE, con espinazo de fosfodiéster. Se realizaron análisis BLAST para cada secuencia de oligonucleótido morfolino a fin de evitar la hibridación fuera del objetivo.

Los bloqueadores estéricos 2'-O-MOE de 18 mer dirigidos a tau se ensayaron *in vitro* para determinar su actividad sobre la inhibición de ARNm de Tau humana. Las células Huh7 se plaquearon a una densidad de 10.000 células por pocillo y se transfectaron usando el reactivo OptiFect (LifeTech Cat # 12579-017) con 25 nM del oligonucleótido antisentido. Después de un período de tratamiento de 48 horas, se preparó ADNc directamente a partir de células cultivadas usando el equipo Fastlane cell multiplex kit (Qiagen Cat. # 216513). Los niveles de ARNm de Tau se midieron mediante la PCR cuantitativa en tiempo real en una reacción de RT-PCR en dupla usando sondas Taqman específicas para MAPT humano (LifeTech AssayID # Hs00902194_m1: FAM-MGB) y control endógeno de TBP humana (proteína de unión de caja TATA) (LifeTech Cat. # 4326322E). Todos los datos se controlaron para establecer la cantidad de entrada de ADNc, y los niveles de ARNm de tau se normalizaron a los niveles del gen de referencia endógeno TBP. Tau y el gen de control TBP se amplificaron en la misma reacción, con altas eficacias de PCR similares, de modo de permitir la cuantificación relativa mediante el método $\Delta\Delta CT$. Los resultados se presentan como porcentaje de ARNm de Tau residual en relación con las células de control tratadas con PBS. La Tabla 2 muestra las actividades de dichos bloqueadores estéricos de 18 mer 2'-O-MOE en células Huh7.

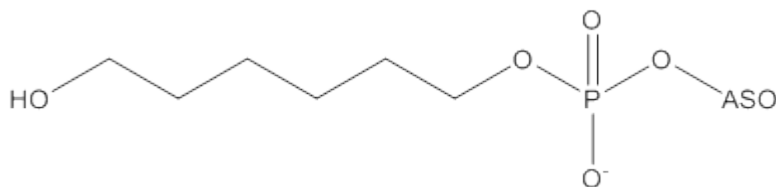
Tabla 2: Inhibición de ARNm de tau por bloqueadores estéricos de 18 mer 2'-O-MOE en células Huh7.

SEQ ID NO	Secuencia ASO ¹	% ARNm residual ²
1	GTCCACTAACCTTTCAGG	19.5
2	GCATCGTCAGCTTACCTT	27.7
3	TATTTGCACCTGGAGATG	38.4
4	GACTATTTGCACCTGGAG	40.8
5	CATGCGAGCTGATAAAAT	40.9
6	ACCATGCGAGCTGATAAA	41.3
7	CCATGCGAGCTGATAAAA	43.3
8	CGTCAGCTTACCTTGGCT	44.1
9	TGACCATGCGAGCTGATA	47.4
10	ATGCGAGCTGATAAAATA	52.1
11	TTTGCACCTGGAGATGAG	52.3
12	TTGCACCTGGAGATGAGA	52.4
13	ATTTGCACCTGGAGATGA	61.9
14	TCCACTAACCTTTCAGGC	68.2
15	GGTTTCAATCTGCAAGAA	68.8
16	CCACTAACCTTTCAGGCC	71.3
17	CACTAACCTTTCAGGCCA	72.9
18	ACTAACCTTTCAGGCCAG	76.7
19	GCTCAGCCATCCTGGTTC	77.3
20	GTTTCAATCTGCAAGAAG	80.4
21	AGTTCACCTGGGGAAAGA	85.8
22	TTGGAGGTTACCTGGGA	85.9
23	GGCTACCTGGTTTATGAT	88.8
24	AAAGTTCACCTGGGGAAA	92.1
25	GTTCACTGACCTTGGGTC	96.8
26	CAAAGTTCACCTGGGGAA	98.4
27	CAGCTTACCTTGGCTTTT	99.8
28	GGGCTACCTGGTTTATGA	101.6
29	TCTTCAGCTGGTGTATGT	103.4
30	TTCAAAGTTCACCTGGGG	103.4
31	CCCTTTACCTTTTTATTT	104.7
32	TGCTTCTTCAGCTGGTGT	106.1
33	TCAGCTTACCTTGGCTTT	106.7
34	CTGCTTCTTCAGCTGGTG	107.9
35	GGCCACCTCCTAGAACAC	108.4
36	TCTTACCAGAGCTGGGTG	108.8
37	AAGTTCACCTGGGGAAAG	109.4
38	GTCAGCTTACCTTGGCTT	109.5
39	GGGGCCTGATCACAAACC	109.7
40	AGGTTCACCTGGGAAGGA	110.2
41	GCTTACCTTGGCTTTTTT	111.4
42	TCAAAGTTCACCTGGGGA	111.7
43	CCACTCTCACCTTCCCGC	112.8

44	CCCCCTTTACCTTTTTAT	113
45	GAGGTTACCTGGGAAGG	113.3
46	GTTACCTGGGAAGGAAG	113.6
47	CACCTCCTAGAACACAAC	114.1
48	ACTCTCACCTTCCCGCCT	114.5
49	TTCAATCTGCAAGAAGAG	114.6
50	ACTGACCTTGGGTACGT	114.7
51	TTTCAATCTGCAAGAAGA	115.1
52	TTCTTACCAGAGCTGGGT	115.5
53	CAGGGCTACCTGGTTTAT	116.1
54	GGGCCTGATCACAAACCC	116.5
55	AGGGCTACCTGGTTTATG	117.2
56	CCACCTCCTAGAACACAA	117.6
57	CACTGACCTTGGGTACG	118.4
58	CCCCTTTACCTTTTTATT	118.4
59	TTCCTGACCTTGGGTCA	118.6
60	GGCCTGATCACAAACCCT	119.6
61	CACTCTCACCTTCCCGCC	119.7
62	CCTGGCCACCTCCTAGAA	120.4
63	CCTTTACCTTTTTATTTT	120.6
64	TCACTGACCTTGGGTAC	121.7
65	GCCTGATCACAAACCCTG	122
66	CTTTACCTTTTTATTTCC	122.5
67	TTCTTCAGCTGGTGTATG	124
68	GCCACCTCCTAGAACACA	126.5
69	TCTCACCTTCCCGCCTCC	127.4
70	CTTCTTACCAGAGCTGGG	129.8
71	TTCTTCTTACCAGAGCTG	131.2
72	ATCAGCCCCCTGTAAATG	131.3
73	GCTTCTTCAGCTGGTGTAT	133.9
74	ACAGGGCTACCTGGTTTA	134.3
75	CTCAGCCATCCTGGTTCA	134.4
76	CAGCCCCCTGTAAATGAA	136.4
77	GGGCTCAGCCATCCTGGT	137.9
78	TCTTCTTACCAGAGCTGG	139
79	CTCTCACCTTCCCGCCTC	143.1
80	TCAGCCCCCTGTAAATGA	145.9
81	CTTCTTCAGCTGGTGTAT	148
82	GGTTCACCTGGGAAGGAA	153.5
83	CATCAGCCCCCTGTAAAT	156.4
84	ACCATCAGCCCCCTGTAA	157.5

1. Cada nucleótido tiene una modificación 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE); y las uniones de internucleósido son fosfodiésteres. Cada oligonucleótido tiene un

enlazador (L1) unido al extremo 3' del ASO a través de un puente de fosfato, y tiene la siguiente estructura:



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

10 **Ejemplo 3: Inhibición de la expresión de Tau humana en células SH-SY5Y por bloqueadores estéricos de 18 mer 2'-O-MOE.**

Los bloqueadores estéricos que disminuyeron significativamente la expresión de tau en el Ejemplo 2 se seleccionaron y evaluaron en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Las células SH-SY5Y cultivadas se nucleofectaron con 1000 nM de un oligonucleótido antisentido seleccionado. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se preparó ADNc directamente a partir de células cultivadas usando el equipo Fastlane cell multiplex kit (Qiagen Cat. # 216513). Los niveles de ARNm de Tau se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando una reacción de RT-PCR en 15
20
25
dupla, se usaron sondas Taqman específicas para MAPT humano (LifeTech AssayID # Hs00902194_m1: FAM-MGB) y GAPDH humana (LifeTech AssayID # Hs02758991_g1: VIC-MGB). Todos los datos se controlaron para determinar la cantidad de entrada de ADNc, y los niveles de ARNm de Tau se normalizaron a los niveles del gen de referencia endógeno GAPDH. Tau y el gen de control GAPDH se amplificaron en la misma reacción, con altas eficacias de PCR similares, lo que

permitió la cuantificación relativa mediante el método $\Delta\Delta CT$. Los resultados se presentan como porcentaje de ARNm de Tau residual en relación con las células de control tratadas con PBS. La Tabla 3 muestra las actividades de los bloqueadores estéricos 2'-O-MOE de 18 mer seleccionados en células SH-SY5Y.

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

ASO SEQ ID NO	% ARNm residual ³
6	5.74
7	6.90
9	8.63
2	9.26
5	9.64
4	14.01
8	14.24
10	15.75
12	26.14
3	29.40
11	34.34
1	37.95

3. % ARNm residual es el nivel de ARNm de tau en las células SH-SY5Y tratadas con una dosis única de 1000 nM de ASO de tau durante 24 horas en
10 comparación con el nivel de ARNm de tau en las células de control tratadas con PBS.

Los bloqueadores estéricos que exhibieron una inhibición *in vitro* significativa del ARNm de tau se evaluaron en diferentes dosis. Las células SH-SY5Y cultivadas se nucleofectaron con 0,125 nM, 0,25 nM, 0,5 nM, 1000 nM, 2000 nM, 4000 nM y
15 8000 nM de un oligonucleótido antisentido seleccionado. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se preparó directamente ADNc, y los niveles de ARNm de tau se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real como se describió anteriormente. La concentración inhibidora máxima media (IC₅₀) se determinó mediante la construcción de una curva de dosis y respuesta y
20 examinando el efecto de diferentes concentraciones de oligonucleótidos antisentido sobre la reducción del ARNm de Tau. Los valores de IC₅₀ se calcularon

determinando la concentración necesaria para inhibir la mitad de la respuesta biológica máxima del compuesto, y se pueden usar como una medida de la potencia del oligonucleótido antisentido. La Tabla 4 muestra los valores de IC50 de los bloqueadores estéricos 2'-O-MOE de 18 mer seleccionados.

5 Tabla 4: IC50 de bloqueadores estéricos seleccionados de 18 mer 2'-O-MOE.

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

Ejemplo 4: Inhibición de la expresión de Tau humana en células SH-SY5Y por bloqueadores estéricos 12-25 mer 2'-O-MOE.

10 Los bloqueadores estéricos que disminuyeron significativamente la expresión de tau en los Ejemplos 2 y 3 se seleccionaron, y se hicieron para tener diferentes longitudes de 12 a 25 nucleósidos de longitud. Estos bloqueadores estéricos de 12-25 mer 2'-O-MOE se evaluaron en células SH-SY5Y. Las células cultivadas SH-SY5Y se nucleofectaron con 2000 nM de un oligonucleótido

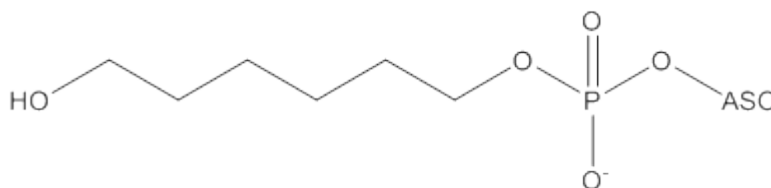
15 antisentido seleccionado. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se preparó directamente ADNc, y se midieron los niveles de ARNm de Tau como se describió anteriormente. La Tabla 5 muestra las actividades de los bloqueadores estéricos de 12-25 mer 2'-O-MOE en células SH-SY5Y.

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

SEQ ID NO	Secuencia ASO ⁴	% ARNm residual ⁵	Longi- tud de ASO	Exón Tau dirigido
85	GT ^m C ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m CAGG ^m C ^m CGTGT ^m C	61.7	25	1
86	GT ^m C ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m CAGG ^m C ^m CGTGT	61.6	24	1
87	GT ^m C ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m CAGG ^m C ^m CGTG	74.7	23	1
88	GT ^m C ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m CAGG ^m C ^m CGT	49.2	22	1
89	GT ^m C ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m CAGG ^m C ^m CG	60.2	21	1
90	GT ^m C ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m CAGG ^m C ^m C	60.6	20	1
91	GT ^m C ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m CAGG ^m C	67.8	19	1
92	GT ^m C ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m CAGG	61.6	18	1
93	GT ^m C ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m CAG	58.7	17	1
94	GT ^m C ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m CA	65.4	16	1
95	GT ^m C ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT ^m C	64.2	15	1
96	GT ^m C ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTTT	72.5	14	1
97	GT ^m C ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CTT	75.3	13	1
98	GT ^m C ^m CA ^m CTAA ^m C ^m CT	87.1	12	1
99	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m CTTGG ^m CTTTT	35.4	25	5
100	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m CTTGG ^m CTTT	35.3	24	5
101	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m CTTGG ^m CTT	37.8	23	5
102	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m CTTGG ^m CT	38.7	22	5
103	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m CTTGG ^m C	50.2	21	5
104	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m CTTGG	49.5	20	5
105	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m CTTG	42.2	19	5
106	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m CTT	25.2	18	5
107	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m CT	15.0	17	5
108	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m C	10.6	16	5
109	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C	14.4	15	5
110	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA	11.9	14	5
111	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTT	19.6	13	5
112	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CT	33.8	12	5
113	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CTGGAGATGAGAG	39.7	25	11
114	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CTGGAGATGAGA	41.1	24	11
115	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CTGGAGATGAG	45.7	23	11
116	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CTGGAGATGA	54.2	22	11
117	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CTGGAGATG	53.2	21	11
118	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CTGGAGAT	63.6	20	11
119	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CTGGAGA	50.6	19	11
120	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CTGGAG	51.0	18	11
121	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CTGGA	38.4	17	11
122	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CTGG	41.2	16	11
123	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CTG	45.6	15	11
124	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m CT	46.8	14	11
125	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C ^m C	47.5	13	11
126	GA ^m CTATTTG ^m CA ^m C	56.2	12	11

127	^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAAATATAAAA	20.0	25	5
128	^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAAATATAAA	14.7	24	5
129	^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAAATATAA	24.9	23	5
130	^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAAATATA	20.3	22	5
131	^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAAATAT	24.3	21	5
132	^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAAATA	27.2	20	5
133	^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAAAT	23.7	19	5
134	^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAAA	24.0	18	5
135	^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAA	19.8	17	5
136	^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAA	17.9	16	5
137	^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATA	23.9	15	5
138	^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGAT	87.6	14	5
139	^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGA	24.6	13	5
140	^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTG	23.1	12	5

4. Cada nucleótido tiene una modificación 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE); y ^mC representa 5-metilcitosina. Las uniones de internucleósido son fosfodiésteres. Cada oligonucleótido tiene un enlazador (L1) unido al extremo 3' del ASO a través de un puente de fosfato, y tiene la siguiente estructura:



5. % ARNm residual es el nivel de ARNm de tau en las células SH-SY5Y tratadas con una dosis única de 2000 nM de ASO de tau durante 24 horas en comparación con el nivel de ARNm de tau en células de control tratadas con PBS.
- 10 Los valores de IC₅₀ de los bloqueadores estéricos seleccionados de 12-25 mer 2'-O-MOE con uniones de internucleósido de fosfodiéster se determinaron como se describió anteriormente, y se muestran en la Tabla 6.

- Se sintetizaron una cantidad de bloqueadores estéricos de 12-25 mer 2'-O-MOE con uniones de internucleósido de fosforotioato, y los valores de IC₅₀ de algunos de estos bloqueadores estéricos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 6: IC₅₀ de bloqueadores estéricos seleccionados de 12-25 mer 2'-O-MOE con uniones de internucleósido de fosfodiéster.

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

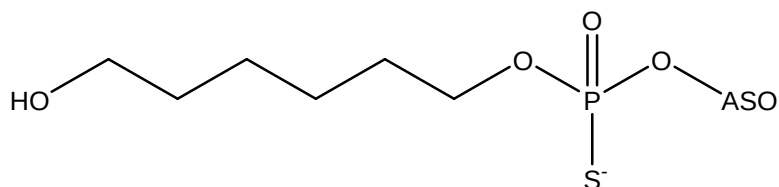
Tabla 7: IC₅₀ de bloqueadores estéricos seleccionados de 12–25 mer 2'–O–

5 MOE con uniones de internucleósido de fosforotioato.

SEQ ID NO	Secuencia de ASO ⁵	IC ₅₀ (nM)	Longitud de ASO
108	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m C	193	16
111	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTT	353	13
109	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C	426	15
107	G ^m CAT ^m CGT ^m CAG ^m CTTA ^m C ^m CT	579	17
140	^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTG	877	12
139	^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGA	930	13
135	^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAA	1201	17
134	^m C ^m CATG ^m CGAG ^m CTGATAAAA	1398	18

5. Cada nucleótido tiene una modificación 2'–O–metoxietilo (2'–O–MOE); y ^mC representa 5–metilcitosina. Las uniones de internucleósido son fosforotioato.

10 Cada oligonucleótido tiene un enlazador (L1) unido al extremo 3' del ASO a través de un puente de fosfato, y tiene la siguiente estructura:



Ejemplo 5: Inhibición de la expresión de Tau humana en células SH-SY5Y por bloqueadores estéricos de 17 mer 2'-O-MOE.

- 5 Se diseñaron bloqueadores estéricos 2'-MOE que tienen 17 nucleósidos de longitud para dirigirse a exones constitutivos en Tau humana. Estos bloqueadores estéricos de 17 mer 2'-O-MOE se evaluaron en células SH-SY5Y. Las células cultivadas SH-SY5Y se nucleofectaron con 2000 nM de un oligonucleótido antisentido seleccionado. Después de un período de tratamiento de
- 10 aproximadamente 24 horas, se preparó directamente ADNc, y se midieron los niveles de ARNm de tau como se describió anteriormente. La Tabla 8 muestra las

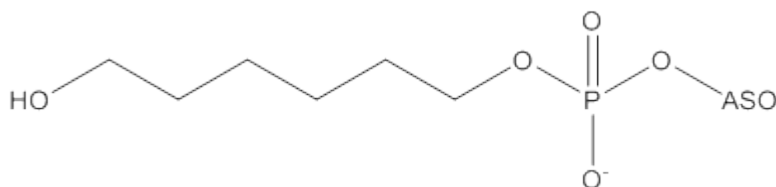
actividades de los bloqueadores estéricos de 17 mer 2'-O-MOE en células SH-SY5Y.

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

SEQ ID NO	Secuencia de ASO ⁶	% ARNm residual ⁷	Exón Tau dirigido
141	AG ^m C ^m CAT ^m C ^m CTGGTT ^m CAAA	131.7	1
142	^m CAG ^m C ^m CAT ^m C ^m CTGGTTCAA	173.6	1
143	T ^m CAG ^m C ^m CAT ^m C ^m CTGGTT ^m CA	148.3	1
144	^m CT ^m CAG ^m C ^m CAT ^m C ^m CTGGTT ^m C	127.7	1
145	GG ^m C ^m CAG ^m CGT ^m C ^m CGTGT ^m CA	115.9	1
146	G ^m C ^m CAG ^m CGT ^m C ^m CGTGT ^m CA ^m C	103.6	1
147	^m C ^m CAG ^m CGT ^m C ^m CGTGT ^m CA ^m C ^m C	96.5	1
148	^m CAG ^m CGT ^m C ^m CGTGT ^m CA ^m C ^m C ^m C	121.9	1
149	GT ^m CT ^m C ^m CAATG ^m C ^m CTG ^m CTT	125.7	4
150	TGT ^m CT ^m C ^m CAATG ^m C ^m CTG ^m CT	120.5	4
151	GTGT ^m CT ^m C ^m CAATG ^m C ^m CTG ^m C	43.5	4
152	GGTGT ^m CT ^m C ^m CAATG ^m C ^m CTG	114.1	4
153	T ^m CA ^m CGTGA ^m C ^m CAG ^m CAG ^m CT	105.1	4
154	^m CA ^m CGTGA ^m C ^m CAG ^m CAG ^m CTT	109.1	4
155	A ^m CGTGA ^m C ^m CAG ^m CAG ^m CTT ^m C	114.6	4
156	^m CGAAG ^m CTG ^m CTGGT ^m CA ^m CG	135.5	4
157	TTTG ^m CTTTTA ^m CTGA ^m C ^m CA	18.9	5
158	^m CTTTG ^m CTTTTA ^m CTGA ^m C ^m C	6.8	5
159	T ^m CTTTG ^m CTTTTA ^m CTGA ^m C	14.2	5
160	GT ^m CTTTG ^m CTTTTA ^m CTGA	68.2	5
161	TTTTTGT ^m CATCG ^m CTT ^m C	18.5	5
162	TTTTTGT ^m CAT ^m CG ^m CTT ^m C ^m C	20.0	5
163	TTTTGT ^m CAT ^m CG ^m CTT ^m C ^m CA	24.4	5
164	TTTGT ^m CAT ^m CG ^m CTT ^m C ^m CAG	30.5	5
165	AT ^m CTT ^m CGTTTTA ^m C ^m CAT ^m C	110.1	7
166	GAT ^m CTT ^m CGTTTTA ^m C ^m CAT	111.2	7
167	^m CGAT ^m CTT ^m CGTTTTA ^m C ^m CA	108.4	7
168	G ^m CGAT ^m CTT ^m CGTTTTA ^m C ^m C	131.1	7
169	TGGGTGGTGT ^m CTTTGGA	104.6	7
170	GGGTGGTGT ^m CTTTGGAG	101.6	7
171	GGTGGTGT ^m CTTTGGAG ^m C	105.3	7
172	GTGGTGT ^m CTTTGGAG ^m CG	107.4	7
173	AT ^m C ^m C ^m C ^m CTGATTTTGGAG	130.3	9
174	GAT ^m C ^m C ^m C ^m CTGATTTTGGGA	117.8	9
175	^m CGAT ^m C ^m C ^m C ^m CTGATTTTGG	99.7	9
176	G ^m CGAT ^m C ^m C ^m C ^m CTGATTTTG	116.1	9
177	G ^m C ^m CT ^m C ^m C ^m CGG ^m CTGGTG ^m CT	129.8	9
178	^m C ^m CT ^m C ^m C ^m CGG ^m CTGGTG ^m CTT	135.7	9
179	^m CT ^m C ^m C ^m CGG ^m CTGGTG ^m CTT ^m C	133.8	9
180	T ^m C ^m C ^m CGG ^m CTGGTG ^m CTT ^m CA	153.5	9
181	A ^m CTGGTTTGTAGA ^m CTAT	32.6	11
182	AA ^m CTGGTTTGTAGA ^m CTA	51.5	11
183	^m CAA ^m CTGGTTTGTAGA ^m CT	29.4	11

184	T ^m CAA ^m CTGGTTTGTAGA ^m C	28.2	11
185	TATGATGGATGTTG ^m C ^m CT	41.7	11
186	ATGATGGATGTTG ^m C ^m CTA	46.4	11
187	TGATGGATGTTG ^m C ^m CTAA	40.9	11
188	GATGGATGTTG ^m C ^m CTAAT	53.6	11
189	TTTTA ^m CTT ^m C ^m CA ^m C ^m CTGG ^m C	130.4	12
190	ATTTTA ^m CTT ^m C ^m CA ^m C ^m CTGG	111.2	12
191	GATTTTA ^m CTT ^m C ^m CA ^m C ^m CTG	119.6	12
192	AGATTTTA ^m CTT ^m C ^m CA ^m C ^m CT	123.1	12
193	ATTT ^m C ^m CT ^m C ^m CG ^m C ^m CAGGGA	78.0	12
194	TTT ^m C ^m CT ^m C ^m CG ^m C ^m CAGGGA ^m C	76.1	12
195	TT ^m C ^m CT ^m C ^m CG ^m C ^m CAGGGA ^m CG	71.5	12
196	T ^m C ^m CT ^m C ^m CG ^m C ^m CAGGGA ^m CGT	89.0	12
197	AAGGT ^m CAG ^m CTTGTGGGT	62.1	13
198	GAAGGT ^m CAG ^m CTTGTGGG	49.9	13
199	GGAAGGT ^m CAG ^m CTTGTGG	59.3	13
200	^m C ^m GGAAGGT ^m CAG ^m CTTGTG	51.9	13
201	A ^m C ^m C ^m CTG ^m CTTGG ^m C ^m CAGGG	116.5	13
202	^m C ^m C ^m CTG ^m CTTGG ^m C ^m CAGGGA	106.1	13
203	^m C ^m CTG ^m CTTGG ^m C ^m CAGGGAG	105.3	13
204	^m CTG ^m CTTGG ^m C ^m CAGGGAGG	133.6	13

6. Cada nucleótido tiene una modificación 2'-O-MOE; y ^mC representa 5-metilcitosina. Las uniones de internucleósido son fosfodiésteres. Cada oligonucleótido tiene un enlazador (L1) unido al extremo 3' del ASO por medio de un puente de fosfato, y tiene la siguiente estructura:



7. % ARNm residual es el nivel de ARNm de tau en las células SH-SY5Y tratadas con una dosis única de 2000 nM de ASO de tau durante 24 horas en comparación con el nivel de ARNm de tau en células de control tratadas con PBS.

10

Ejemplo 6: Inhibición de la expresión de Tau humana en células Huh7 por gámpmeros 5-10-5.

Las secuencias de oligonucleótidos antisentido se diseñaron para que fueran complementarias a la isoforma de Tau más corta, la variante de transcripción 4,

ARNm (GenBank: NM_016841.4). Se realizaron análisis BLAST para cada secuencia de oligonucleótidos a fin de evitar la hibridación fuera del objetivo. Los oligonucleótidos antisentido quiméricos modificados recientemente diseñados se diseñaron como gápmers 5–10–5 que tienen 20 nucleósidos de longitud, en los
 5 que el segmento de brecha gap central comprende diez 2'-desoxinucleósidos y está flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprenden cinco nucleósidos cada uno, con una modificación de azúcar ribosa 2'-O-MOE. Las uniones de internucleósido a lo largo de cada gápmers son uniones de fosforotioato (P = S).

10 Los gápmers dirigidos a tau se evaluaron para establecer la inhibición de la expresión de ARNm de Tau humana *in vitro*. Las células Huh7 se plaquearon a una densidad de 10.000 células por pocillo y se transfectaron usando el reactivo OptiFect (LifeTech Cat. # 12579–017) con 25 nM del oligonucleótido antisentido. Después de un período de tratamiento de 48 horas, se preparó ADNc directamente
 15 a partir de células cultivadas usando el equipo Fastlane cell multiplex kit (Qiagen Cat. # 216513). Los niveles de ARNm de Tau se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real en una reacción de RT-PCR en dupla usando sondas Taqman específicas para MAPT humana (LifeTech AssayID # Hs00902194_m1: FAM-MGB) y control endógeno de TBP humana (proteína de unión de caja TATA)
 20 (LifeTech Cat. # 4326322E). Todos los datos se controlaron para establecer la cantidad de entrada de ADNc, y los niveles de ARNm de Tau se normalizaron a los niveles del gen de referencia endógeno TBP. Tau y el gen de control TBP se amplificaron en la misma reacción con altas eficacias de PCR similares, de modo de permitir la cuantificación relativa mediante el método $\Delta\Delta CT$. Los resultados se
 25 presentan como porcentaje de ARNm de Tau residual en relación con las células de control tratadas con PBS. La Tabla 9 muestra las actividades de los gápmers en células Huh7.

Tabla 9: Inhibición del ARNm de Tau por gápmers 5–10–5 MOE en células

Huh7.

SEQ ID NO	Secuencia deASO ⁸	% RNA m residual ⁹
205	C*C*G*T*A*CGTCCCAGCGT*G*A*T*C*	22.5
206	G*G*C*T*C*AGCCATCCTGG*T*T*C*A*	26.4
207	C*C*C*G*T*ACGTCCCAGCG*T*G*A*T*	29
209	G*G*G*C*T*CAGCCATCCTG*G*T*T*C*	30.1
210	G*G*C*C*A*GCGTCCGTGTC*A*C*C*C*	32.8
211	G*G*C*T*C*TCCCAGCGGCA*A*G*G*A*	32.8
212	C*C*C*T*C*TTGGTCTTGGT*G*C*A*T*	33.2
213	C*G*G*G*A*CCTGCCTCCCA*G*A*C*C*	33.6
214	G*C*T*G*G*TCTCTGTTGGG*T*C*C*C*	34.5
215	G*G*G*C*T*CTCTCCATGTC*A*A*C*A*	34.6
216	G*G*T*C*T*CTGTTGGGTCC*C*A*G*G*	34.9
217	G*G*G*A*C*CTGCCTCCCAG*A*C*C*C*	35.2
218	C*C*C*A*A*CCCGTACGTCC*C*A*G*C*	37.4
219	G*C*T*T*C*GTCTTCCAGGC*T*G*G*G*	39
220	C*C*G*T*G*TCACCCTCTTG*G*T*C*T*	40.8
221	C*T*T*G*G*CTCTCCCAGCG*G*C*A*A*	40.8
222	C*G*G*C*C*TCCTTAGCTGC*T*A*G*A*	41.7
223	C*A*G*C*G*TCCGTGTCACC*C*T*C*T*	42.8
224	G*C*T*C*A*GCCATCCTGGT*T*C*A*A*	42.9
225	C*C*T*G*G*ACTTTGCCTTC*C*C*T*T*	43.5
226	G*T*C*C*C*ACTCTTGTGCC*T*G*G*A*	44.1
227	A*C*C*T*G*GCCACCTCCTG*G*T*T*T*	45
228	T*T*G*G*C*TTTGGCGTTCT*C*G*C*G*	45.1
229	C*G*C*T*T*CCAGTCCCGTC*T*T*T*G*	46.4
230	G*G*T*G*A*TCACCTCTGCC*C*T*C*G*	46.4
231	G*G*T*A*C*CTCCTGCAACC*A*A*C*C*	47.7
232	C*A*C*G*T*GGCTTCCTCTC*C*C*A*C*	49.4
233	G*C*G*T*C*CGTGTACCCCT*C*T*T*G*	50.6
234	C*A*C*C*C*TCTTGGTCTTG*G*T*G*C*	52.3
235	G*T*C*C*C*AGCGTGATCTT*C*C*A*T*	52.5
236	G*C*C*A*G*CACTGATCACC*C*T*A*A*	53.1
237	T*G*G*T*C*TCTGTTGGGTC*C*C*A*G*	53.6
238	C*C*G*C*C*TCCCGGCTGGT*G*C*T*T*	55.6
239	G*G*C*C*A*CACGAGTCCCA*G*T*G*T*	58.2
240	G*T*C*C*C*TCAGGGTTGCC*T*T*T*A*	58.5
241	G*G*A*C*C*ACTGCCACCTT*C*T*T*G*	58.8
242	C*A*C*C*T*GGCCACCTCCT*G*G*T*T*	58.9

243	C*C*C*G*C*CTCCCGGCTGG*T*G*C*T*	59.7
244	G*G*T*G*C*CTTGCCCTTCC*A*T*C*C*	60.3
245	C*C*C*G*T*CACACTCACAC*A*A*G*G*	61.1
246	C*C*C*A*A*TCCCTGCTGTG*G*T*C*G*	61.4
247	G*G*G*T*C*CCACTCTTGTG*C*C*T*G*	62.9
248	G*C*T*T*C*CAGTCCCGTCT*T*T*G*C*	63
249	C*C*C*T*T*CTCCCACAGGC*T*G*C*C*	63.1
250	C*T*G*G*T*GCCACCACTGA*C*A*A*C*	63.2
251	G*C*C*A*C*TGCCTCTGTGA*C*A*C*C*	63.3
252	G*T*G*C*C*ACCACTGACAA*C*C*A*A*	63.5
253	C*T*T*G*C*CCTTCCATCCT*G*G*T*G*	63.7
254	G*C*C*T*G*GACTTTGCCTT*C*C*C*T*	64.3
255	G*C*C*T*C*TAACCTCCGTGG*C*T*G*C*	65.1
256	G*A*T*C*C*CAGAGCCTTCC*G*T*A*T*	66.3
257	C*A*T*C*C*TCGCGCCGCAA*G*C*C*A*	66.7
258	G*C*C*T*C*CCGGCTGGTGC*T*T*C*A*	66.8
259	G*T*G*C*C*TGGACTTTGCC*T*T*C*C*	67.1
260	C*T*G*C*C*ACTGCCTCTGT*G*A*C*A*	69.7
261	C*C*T*G*G*CCACCTCCTGG*T*T*T*A*	70.3
262	G*G*G*T*G*CCCTTGCCCTT*C*A*T*C*	71.1
263	C*C*A*C*T*CCCACCTTCTTG*T*G*C*T*	71.8
264	G*T*G*C*T*TCAGGCCTTCG*T*C*A*C*	74.6
265	C*T*G* ^m C*C*AGCTTGCCCTT*C*T*T*	75.9
266	C*T*C*C*C*GGCTGGTGCTT*C*A*G*G*	76.2
267	C*G*C*C*T*CCCGGCTGGTG*C*T*T*C*	78
268	C*T*G*G*C*CACCTCCTGGT*T*T*A*T*	78.7
269	G*G*C*C*A*CCTCCTGGTTT*A*T*G*A*	79.1
270	C*C*A*T*C*CTGGTGCCACC*A*C*T*G*	82.9
271	C*C*T*G*C*CAGCTTGCCCTT*C*T*C*T*	83.7
272	A*A*T*C*C*CTGCTGTGGTC*G*C*A*G*	83.7
273	G*C*C*A*C*CACTGACAACC*A*A*G*A*	84.1
274	C*T*T*G*T*CGGCCATGAT*A*T*A*G*	87.7
275	T*A*A*G*C*AGTGGGTTCTC*T*A*G*T*	88
276	C*C*T*C*C*CGGCTGGTGCTT*C*A*G*	88.8
277	C*T*C*C*T*GCCAGCTTGCC*T*T*C*T*	92.2
278	C*T*T*C*T*CCTCCGGCCAC*T*A*G*T*	93.6
279	C*T*C*C*T*CCGGCCACTAG*T*G*G*G*	94.2
280	C*C*T*T*C*TCCTCCGGCCA*C*T*A*G*	94.9
281	G*A*G*C*C*TTCTCCTCCGG*C*C*A*C*	105.7
282	G*C*C*T*T*CTCCTCCGGCC*A*C*T*A*	112.5
283	C*C*T*T*A*CCTGCTAGCTG*G*C*G*T*	128.7

8. Los nucleótidos con * tienen una modificación 2'-O-MOE; los nucleótidos sin * son 2'-desoxinucleósidos. Las uniones de internucleósidos son fosforotioato.

9. % ARNm residual es el nivel de ARNm de tau en las células Huh7 tratadas con una sola dosis de ASO de tau a 25 nM durante 48 horas en comparación con el nivel de ARNm de tau en las células de control Huh7 tratadas con PBS.

Ejemplo 7: Inhibición de la expresión de Tau humana en células SH-SY5Y por gápmeros 5-10-5.

Los gápmeros que disminuyeron significativamente la expresión de ARNm de Tau en el Ejemplo 6 se seleccionaron y se evaluaron en células SH-SY5Y. Las células SH-SY5Y cultivadas se nucleofectaron con oligonucleótido antisentido 2000 nM. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se preparó ADNc directamente a partir de células cultivadas usando el equipo Fastlane cell multiplex kit (Qiagen Cat. # 216513). Los niveles de ARNm de Tau se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando una reacción de RT-PCR en 10
15
20
25
dupla; se usaron sondas Taqman específicas para MAPT humana (LifeTech AssayID # Hs00902194_m1: FAM-MGB) y GAPDH humana (LifeTech AssayID # Hs02758991_g1: VIC-MGB). Todos los datos se controlaron para establecer la cantidad de entrada de ADNc, y los niveles de ARNm de Tau se normalizaron a los niveles del gen de referencia endógeno GAPDH. Tau y el gen de control GAPDH se amplificaron en la misma reacción, con altas eficacias PCR similares, lo que permitió la cuantificación relativa mediante el método $\Delta\Delta CT$. Los resultados se presentan como porcentaje de ARNm de Tau residual en relación con las células de control tratadas con PBS. La Tabla 10 muestra las actividades de los gápmeros 5-10-5 seleccionados en las células SH-SY5Y. Los valores de IC50 de los gápmeros 5-10-5 seleccionados con 5-metilcitosinas se determinaron en células SH-SY5Y como se describió anteriormente, y se muestran en la Tabla 11.

Tabla 10: Inhibición de ARNm de Tau por gápmers 5–10–5 en células SH–SY5Y.

ASO SEQ ID NO	% RNAm residual ¹⁰
204	3.0
205	7.6
202	10.7
203	15.3
207	24.6
209	34.3
210	46.9
206	51.4
211	62.1
201	83.2

10. % ARNm residual es el nivel de ARNm de tau en las células SH–SY5Y
5 tratadas con una sola dosis de 2000 nM de ASO de tau durante 24 horas en comparación con el nivel de ARNm de tau en células de control tratadas con PBS.

Tabla 11: IC₅₀ de gápmers 5–10–5 seleccionados con 5–metilcitosina en células SH–SY5Y.

SEQ ID NO	Secuencia ASO ¹¹	IC ₅₀ (nM)
284	mC*mC*G*T*A*mCGTmCmCmCAGmCGT*G*A*T*mC*	331
286	G*G*G*mC*T*mCAGmCmCATmCmCTG*G*T*T*mC*	268
287	G*G*mC*T*mC*TmCmCmCAGmCGGmCA*A*G*G*A*	78
288	mC*mC*mC*T*mC*TTGGTmCTTGGT*G*mC*A*T*	366
289	G*mC*T*G*G*TmCTmCTGTTGGG*T*mC*mC*mC*	133
290	G*T*mC*mC*mC*A*mCTmCTTGmTGmCmC*T*G*G*A*	458
291	G*G*G*mC*T*mCTmCTmCATGTmC*A*A*mC*A*	118

10 11. Los nucleótidos con * tienen una modificación 2'–O–MOE; los nucleótidos sin * son 2'–desoxinucleósidos; y mC representa 5–metilcitosina. Las uniones de internucleósido son fosforotioato.

Ejemplo 8: Caracterización de oligonucleótidos antisentido dirigidos a MAPT.

Los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a MAPT se caracterizaron usando el instrumento de espectrometría de masas/cromatografía líquida de alto rendimiento (LC–MS) de Thermo Scientific. Este método se utilizó para confirmar las masas esperadas de oligonucleótido antisentido (ASO) y proporcionar información sobre la pureza de la muestra y la identificación de los principales componentes presentes. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido que comprende la SEQ ID NO: 284 tiene la estructura mostrada en la FIG. 1A, y la fórmula de C₂₃₀H₃₂₁N₇₂O₁₂₀P₁₉S₁₉. Por lo tanto, el peso molecular esperado para ASO que comprende la SEQ ID NO: 284 es alrededor de 7212,3 Da. La Fig. 1B muestra que la masa de pico para ASO que comprende la SEQ ID NO: 284 medida por LC–MS es 7214.3 Da. La Fig. 1C muestra el informe de pico de deconvolución de LC–MS para ASO que comprende la SEQ ID NO: 284.

15

Ejemplo 9: Prueba *in vivo* de gámpmeros dirigidos a MAPT.

Generación de ratones transgénicos de Tau humana (hTau).

Los vectores BAC (pBACe3.6) que contenían el gen tau humano MAPT se obtuvieron de genotecas genómicas humanas de Life Technologies. Tres vectores que se predijo contenían todas las regiones reguladoras del gen MAPT fueron cribados. El ADN genómico humano se sometió a PCR estándar para evaluar la presencia de cada exón; se usaron también cebadores que abarcaban intrones del gen tau humano y regiones reguladoras para determinar la secuencia de los clones. La comparación con el ADN humano mostró que un clon (RP11 669E14) estaba intacto para todas las porciones del gen tau. Este vector BAC se usó para generar ratones transgénicos BAC hTau. El ADN purificado se inyectó en embriones fertilizados de ratones C57BL/6. El ADN de cola de las crías fundadoras se digirió

25

con enzimas de restricción y se hibridó con sondas específicas de exón, usando ADN humano digerido de manera similar como control para evaluar la integridad del transgén. Las crías fundadoras positivas se expandieron. Se generaron varias líneas transgénicas BAC hTau, y una línea mostró expresión de proteína y ARNm de MAPT humano (Figuras 2A–2C). Esta línea expresaba las seis transcripciones del cerebro humano y las isoformas de proteínas encontradas en el cerebro humano (Figuras 2A–2C). Los ratones transgénicos heterocigotos BAC hTau portan una copia del transgén, y los niveles de expresión de ARN y tau humana son comparables a la expresión de Tau murina endógena.

10 Noqueo *in vivo* de Tau humana por oligonucleótidos antisentido.

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

hipocampo o la corteza y se examinó para establecer el nivel de expresión de la proteína tau humana mediante ELISA y se normalizó al nivel de proteína total.

La actividad *in vivo* de gápmeros 5–10–5 se ensayó usando los métodos descritos anteriormente. Como se muestra en la Tabla 12, ambos oligonucleótidos antisentido inhibieron significativamente la expresión de ARNm de tau humana en la corteza y el hipocampo 2 semanas después de una única inyección ICV de oligonucleótidos antisentido. El noqueo del ARNm de tau humana fue aproximadamente del 42% tanto en la corteza como en el hipocampo para el gápmero que comprendía SEQ ID NO: 284. Para el nivel de proteína tau después de 2 semanas de tratamiento con ASO, el gápmero que comprendía SEQ ID NO: 284 noqueó alrededor del 36% de la expresión de la proteína tau en la corteza. No observamos una reducción significativa del nivel de proteína tau en el hipocampo después de 2 semanas de tratamiento con ASO.

Tabla 12: Inhibición de la expresión de ARNm y proteína Tau por gápmeros

5–10–5 MOE *in vivo*.

ASO SEQ ID NO	% ARNm tau residual dos semanas después de tratamiento de ASO ¹²		% proteína tau residual dos semanas después de tratamiento de ASO ¹³	
	Corteza	Hipocampo	Corteza	Hipocampo
284	58.8	56.77	64	100

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

13. % de proteína tau residual es el nivel de proteína tau en el tejido cerebral indicado de ratones transgénicos BAC hTau dos semanas después de una única inyección ICV del ASO indicado, en comparación con el nivel de proteína tau en el

tejido cerebral correspondiente de ratones transgénicos BAC hTau de control que no fueron tratados con ASO.

El nivel de ARNm y proteína Tau también se evaluaron 4 semanas después de la inyección única ICV de los gápmeros.

- 5 A fin de detectar la distribución cerebral de los oligonucleótidos antisentido en el cerebro de ratones transgénicos BAC hTau, se realizaron experimentos de hibridación *in situ* usando una sonda de ácido nucleico bloqueado marcada con digoxigenina doble (DIG) (LNA™, Exiqon). Las sondas de LNA de doble DIG complementarias a los oligonucleótidos antisentido objetivo se hibridaron durante
- 10 la noche. Luego se detectaron las sondas usando un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina anti DIG de oveja (Roche Diagnostics, Cat. # 11093274910) y la reacción colorimétrica de tetrazolio nitro azul conjugado con el sustrato fosfatasa alcalina 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato (BCIP).

15

Ejemplo 10: Inhibición de la expresión de Tau humana en células Huh7 y SH-SY5Y por gápmeros 5-10-5 adicionales con 5-metilcitosina.

- Se ensayaron secuencias de gápmeros adicionales con 5-metilcitosina dirigidos a tau para inhibir la expresión de ARNm de Tau humana *in vitro* en células
- 20 Huh7 y SH-SY5Y, como se describió anteriormente. Los resultados se presentan como porcentaje de ARNm de Tau residual en relación con las células de control tratadas con PBS. La Tabla 13 muestra las actividades de secuencias cribadas adicionales de gápmeros 5-10-5 en células Huh7 y SH-SY5Y.

- 25 Tabla 13: Inhibición de ARNm de Tau por gápmeros 5-10-5 MOE en células Huh7 y SH-SY5Y.

SEQ ID NO	Secuencia ASO ¹⁴	% ARNm residual en células SHSY5Y ¹⁵	% ARNm residual en células Huh7 ¹⁶
307	G*mC*mC*mC*T*T*CTGG*mC*CTGGA*G*G*G*G*	66.8	34.7
308	T*G*G*mC*mC*mC*CTT*CTGG*mC*CTG*G*A*G*G*	57.7	41.1
309	G*mC*T*G*G*TG*CTT*CAAGTT*mC*T*mC*A*	60.4	42.7
310	T*mC*A*G*G*T*CAA*CTGGTTT*G*T*A*G*	30.5	37.3
311	T*G*mC*T*mC*AGGT*CAA*CTGG*T*T*T*G*	42.6	35.5
312	T*T*G*mC*T*mCAGGT*CAA*CTG*G*T*T*T*	44.9	44.7
313	mC*mC*T*T*G*mC*CT*CAAGGT*CAA*mC*T*G*G*T*	10.3	20.9
314	mC*mC*mC*T*mC*TT*CTA*CATGGA*G*G*G*G*	67.7	51.3
315	T*T*mC*T*mC*mC*CT*CTT*CTA*mC*A*T*G*G*A*	76.7	95.1
316	mC*T*T*mC*T*mC*mC*CT*CTT*CTA*mC*A*T*G*G*	68.2	77.6
317	mC*mC*T*T*mC*T*mC*mC*CT*CTT*CTA*mC*A*T*G*	50.4	72.3
318	mC*A*A*A*T*mC*CTTTGTTG*CT*G*mC*mC*A*	33.6	54.4
319	T*mC*A*A*A*T*mC*CTTTGTTG*CT*G*mC*mC*	28.5	44.5
320	T*G*G*mC*T*mC*CA*CGAA*CA*mC*A*mC*A*A*	24.2	55.1
321	G*T*G*G*mC*T*mC*CA*CGAA*CA*mC*A*mC*A*	22.9	51.6
322	T*G*T*G*G*mC*T*mC*CA*CGAA*CA*mC*A*mC*	25.4	62.4
323	mC*T*G*T*G*G*CT*mC*CA*CGAA*CA*mC*A*mC*	31.1	49.2
324	mC*mC*T*G*T*GG*CT*mC*CA*CGAA*CA*mC*A*	34.8	56.7
325	G*mC*mC*T*G*TG*CT*mC*CA*CGA*A*mC*A*mC*	31.4	51.3
326	T*G*mC*mC*T*GT*GG*CT*mC*CA*CG*A*A*mC*A*	24.2	50.2
327	mC*T*G*mC*mC*TGT*GG*CT*mC*CA*CG*A*A*mC*	18.9	56.7
328	T*mC*T*G*mC*mC*CTGT*GG*CT*mC*CA*CG*A*A*	25.0	43.7
329	G*T*mC*T*G*mC*CTGT*GG*CT*mC*CA*CG*A*	10.1	35.5
330	mC*G*T*mC*T*G*mC*CTGT*GG*CT*mC*CA*CG*	12.6	37.9
331	T*mC*G*T*mC*TG*CT*GT*GG*CT*mC*CA*CG*	9.1	44.6
332	A*T*mC*G*T*mC*TG*CT*GT*GG*CT*mC*CA*	18.8	55.4
333	mC*A*T*mC*G*T*CT*GT*GG*CT*mC*CA*	17.1	62.3
334	A*mC*A*T*mC*GT*CT*GT*GG*CT*mC*CA*	14.3	57.7
335	G*A*mC*A*T*mC*CGT*CT*GT*GG*CT*mC*CA*	11.7	33.5
336	T*G*A*mC*A*T*mC*CGT*CT*GT*GG*CT*mC*	15.2	38.4
337	T*T*G*A*mC*A*AT*CGT*CT*GT*GG*CT*mC*	26.2	43.3
338	G*T*T*G*A*mC*CAT*CGT*CT*GT*GG*CT*mC*	18.0	44.5
339	A*G*G*T*T*GA*CAT*CGT*CT*GT*GG*CT*mC*	23.4	48.9
340	A*A*G*G*T*TG*CAT*CGT*CT*GT*GG*CT*mC*	17.2	38.6
341	mC*A*A*G*G*TT*GA*CAT*CGT*CT*GT*GG*CT*	25.7	47.4
342	A*mC*A*A*G*G*TT*GA*CAT*CGT*CT*GT*GG*	24.3	43.0
343	mC*A*mC*A*A*GG*TT*GA*CAT*CGT*CT*GT*	28.9	52.9
344	A*mC*A*mC*A*AG*TT*GA*CAT*CGT*CT*GT*	23.0	51.4
345	mC*A*mC*A*mC*AAG*TT*GA*CAT*CGT*CT*GT*	33.5	78.2

346	T*mC*A*mC*A*mCAAGGTTGA ^m CA*T*mC*G*T*	44.4	60.4
347	mC*T*mC*A*mC*A ^m CAAGGTTGA ^m C*A*T*mC*G*	35.4	67.6
348	A*mC*T*mC*A*mCA ^m CAAGGTTGA ^m C*A*T*mC*	61.9	66.1
349	mC*A*mC*T*mC*A ^m CA ^m CAAGGTTG*A*mC*A*T*	67.3	72.0
350	A*mC*A*mC*T*mCA ^m CA ^m CAAGGTT*G*A*mC*A*	64.0	72.7
351	mC*A*mC*A*mC*T ^m CA ^m CA ^m CAAGGT*T*G*A*mC*	46.3	64.8
352	T*mC*A*mC*A*mCT ^m CA ^m CA ^m CAAGG*T*T*G*A*	55.9	73.2
353	G*T*mC*A*mC*A ^m CT ^m CA ^m CA ^m CAAG*G*T*T*G*	31.9	53.3
354	mC*G*T*mC*A*mCA ^m CT ^m CA ^m CA ^m CAA*G*G*T*T*	29.1	57.6
355	mC*mC*G*T*mC*A ^m CA ^m CT ^m CA ^m CA ^m CA*A*G*G*T*	33.5	57.7
356	mC*mC*mC*mC*G*T ^m CA ^m CA ^m CT ^m CA ^m CA ^m C*A*A*G*	33.3	70.1
357	mC*mC*mC*T*T*mCT ^m C ^m CA ^m CAGG ^m C*T*G*mC*mC*	40.3	65.4
358	mC*A*T*mC*A*AGGT ^m CAGT ^m CTT*T*T*mC*T*	43.5	61.8
359	mC*mC*A*A*mC ^m CTT ^m CAGAA ^m CT ^m C*A*A*T*A*	30.7	71.0
360	T*mC*mC*A*A*mC ^m CTT ^m CAGAA ^m CT ^m mC*A*A*T*	30.7	77.6
361	T*T*mC*mC*A*A ^m C ^m CTT ^m CAGAA ^m C*T*mC*A*A*	29.7	66.5
362	G*T*T*mC*mC*AA ^m C ^m CTT ^m CAGAA ^m C*T*mC*A*	22.9	72.7
363	A*G*T*T*mC*mCAA ^m C ^m CTT ^m CAGA*A*mC*T*mC*	47.6	66.5
364	mC*A*G*T*T*mC ^m CAA ^m C ^m CTT ^m CAG*A*A*mC*T*	63.6	70.0
365	G*mC*A*G*T*T ^m C ^m CAA ^m C ^m CTT ^m CA*G*A*A*mC*	28.6	47.6
366	G*T*mC*mC*mC*AGGT ^m CTG ^m CAAA*G*T*G*G*	18.1	41.7
367	A*A*G*T*mC*mC ^m CAGGT ^m CTG ^m CA*A*A*G*T*	48.5	68.1
368	A*A*A*G*T ^m C ^m CAGGT ^m CTG ^m C*A*A*A*G*	53.0	73.7
369	G*G*mC*A*mC*AAGT ^m C ^m CTTA ^m CA*A*A*G*A*	43.7	80.9
370	A*G*G*mC*A ^m CAAGT ^m C ^m CTTA ^m C*A*A*A*G*	41.8	76.8
371	T*mC*A*mC*mC ^m CT ^m CAGTATGGA*G*T*A*G*	35.8	67.9
372	T*T*mC*A*mC ^m C ^m CT ^m CAGTATGG*A*G*T*A*	35.7	58.3
373	T*T*T*mC*A ^m C ^m C ^m CT ^m CAGTATG*G*A*G*T*	33.9	65.5
374	A*T*T*T ^m C*A ^m C ^m C ^m CT ^m CAGTAT*G*G*A*G*	51.1	54.0
375	A*A*T*T*T ^m CA ^m C ^m C ^m CT ^m CAGTA*T*G*G*A*	86.4	67.7
376	mC*mC*T*T*A*ATTT ^m CA ^m C ^m C ^m CT ^m C*A*G*T*A*	35.6	72.8
377	mC*mC*mC*T*T*AAATTT ^m CA ^m C ^m C ^m CT ^m C*A*G*T*	32.4	60.4
378	T*mC*mC*mC*T*TAATTT ^m CA ^m C ^m C ^m C ^m T*mC*A*G*	26.7	71.7
379	T*T*mC*mC*mC*TTAATTT ^m CA ^m C ^m C ^m C ^m T*mC*A*	20.4	73.9
380	mC*T*T*mC*mC*mC*TTAATTT ^m CA ^m C ^m C ^m C ^m T*mC*	28.1	86.4
381	A*mC*T*mC*T*TGTG ^m C ^m CTGGA ^m C*T*T*T*G*	32.4	44.6
382	mC*A*mC*T*mC*TTGTG ^m C ^m CTGGA ^m C*T*T*T*	33.4	58.2
383	mC*mC*A*mC*T*mCTTGTG ^m C ^m CTGG*A*mC*T*T*	26.8	68.5
384	mC*mC*mC*A*mC*T ^m CTTGTG ^m C ^m CTG*G*A ^m C*T*	16.5	43.4
385	T*mC*mC*mC*A ^m CT ^m CTTGTG ^m C ^m CT*G*G*A ^m C*	10.6	38.9
386	G*T ^m C ^m C ^m C*A ^m CT ^m CTTGTG ^m C ^m C*T*G*G*A*	23.0	37.4
387	G*G*T ^m C ^m C ^m CA ^m CT ^m CTTGTG ^m C ^m C*T*G*G*	31.0	36.9
388	G*G*G*T ^m C ^m C ^m CA ^m CT ^m CTTGTG ^m C ^m C*T*G*	45.9	47.5
389	G*T*G ^m C ^m C ^m CTGG ^m CT ^m CA ^m CAT ^m C*T*G*T*	42.8	81.7
390	A*G*T*G ^m C ^m C ^m CTGG ^m CT ^m CA ^m CA*T*mC*T*G*	28.1	51.0

391	mC*A*G*T*G*mCmCmCTGGmCTmCAmC*A*T*mC*T*	49.1	85.8
392	G*mC*A*G*T*GmCmCmCTGGmCTmCA*mC*A*T*mC*	34.4	65.8
393	A*G*mC*A*G*T*GmCmCmCTGGmCTmC*A*mC*A*T*	40.5	72.6
394	T*G*A*G*mC*A*G*T*GmCmCmCTGGmC*T*mC*A*mC*	91.8	57.9
395	G*mC*A*T*G*GmCCTTmCmCAGmCTG*G*G*A*mC*	38.5	60.3
396	A*G*mC*T*G*mCCTmCmCAGmCAGAA*mC*A*G*A*	80.8	78.5
397	T*A*T*A*T*GTTmCAGmCTGmCT*mC*mC*A*G*	89.9	63.2
398	G*T*A*T*A*T*GTTmCAGmCTGmC*T*mC*mC*A*	55.2	64.3
399	T*G*T*A*T*ATGTTmCAGmCTGmC*T*mC*mC*	59.9	74.6
400	G*mC*A*G*G*GmCAAmCATmCTAT*G*T*A*T*	58.3	73.2
401	G*G*mC*A*G*GGmCAAmCATmCTA*T*G*T*A*	61.5	74.5
402	G*G*G*mC*A*GGGmCAAmCATmCT*A*T*G*T*	48.1	68.0
403	T*mC*A*mC*T*mCCTGGTGAATmCmC*A*A*G*mC*	21.9	54.5
404	G*T*mC*A*mC*TmCTGGTGAATmC*mC*A*A*G*	13.8	61.3
405	A*G*T*mC*A*mCCTmCTGGTGAATmC*mC*A*A*	15.1	55.2
406	T*A*G*T*mC*A*mCCTmCTGGTGAATmC*mC*A*	36.7	70.9
407	A*T*A*G*T*mCAmCTmCTGGTGA*A*T*mC*mC*	42.4	76.6
408	mC*A*T*A*G*TmCAmCTmCTGGTG*A*A*T*mC*	57.0	77.2
409	T*mC*A*T*A*GTmCAmCTmCTGGT*G*A*A*T*	45.8	65.5
410	mC*T*G*G*T*mCCTmCTGTTGGGTmC*mC*mC*A*	37.2	60.5
411	A*T*mC*mC*T*GTGmCTTmCAGGmC*mC*T*T*mC*	31.2	66.6
412	A*A*T*mC*mC*T*GTGmCTTmCAGGmC*mC*T*T*	41.2	73.5
413	mC*T*A*A*T*mCmCTGTGmCTTmCA*G*G*mC*mC*	38.7	65.1
414	mC*mC*T*A*A*TmCmCTGTGmCTTmC*A*G*G*mC*	31.9	64.8
415	T*mC*mC*T*A*ATmCmCTGTGmCTTmC*A*G*G*	45.9	73.6
416	G*T*mC*mC*T*AATmCmCTGTGmCTTmC*A*G*	50.0	80.9
417	A*G*T*mC*mC*TAATmCmCTGTGmC*T*T*mC*A*	51.9	77.1
418	mC*A*G*T*mC*mC*TAATmCmCTGTGmC*T*T*mC*	53.2	68.4
419	T*mC*A*G*T*mCmC*TAATmCmCTGT*G*mC*T*T*	58.9	78.3
420	T*T*mC*A*G*TmCmC*TAATmCmCTG*T*G*mC*T*	51.1	72.9
421	mC*T*T*mC*A*GTmCmC*TAATmCmCT*G*T*G*mC*	49.4	69.1
422	G*mC*T*T*mC*A*GTmCmC*TAATmCmC*T*G*T*G*	39.5	56.8
423	G*G*A*G*T*TGTAAGmCmCTmCmC*T*T*T*G*	61.8	66.4
424	G*mC*T*mC*T*GGTmCAAGGmCTT*T*G*G*G*	33.8	49.8
425	T*G*mC*T*mC*T*GGTmCAAGGmCT*T*T*G*G*	37.9	55.5
426	G*T*G*mC*T*mCCTGGTmCAAGGmC*T*T*T*G*	48.0	74.1
427	G*G*T*G*mC*TmCTGGTmCAAGGmC*T*T*T*	51.4	68.7
428	T*G*A*G*G*TGmCTmCTGGTmCA*A*G*G*mC*	38.0	72.9
429	T*T*T*mC*T*mCATGGmCAGmCAG*A*T*G*G*	87.5	84.7
430	T*G*mC*T*G*AGTTTmCTTTAG*G*mC*A*G*	61.8	94.7
431	mC*T*G*mC*T*GAGTTTmCTTTA*G*G*mC*A*	51.5	61.1
432	G*mC*T*G*mC*T*GAGTTTmCTTTA*G*G*mC*	46.5	94.4
433	G*G*mC*T*G*mCCTGAGTTTmCTT*T*A*G*G*	61.8	80.4
434	A*G*G*mC*T*GmCTGAGTTTmCT*T*T*A*G*	68.1	74.7
435	G*A*G*G*mC*T*GmCTGAGTTTmC*T*T*T*A*	52.3	83.7
436	T*G*A*G*G*mCCTGmCTGAGTTTmC*T*T*T*	62.3	71.5

437	mC*T*G*mC*mC*AAGT ^m C ^m C ^m CT ^m CAG*G*G*T*T*	43.3	74.6
438	A*mC*T*G*mC*mC*CAAGT ^m C ^m C ^m CT ^m CA*G*G*G*T*	53.4	78.8
439	T*A*mC*T*G*mC*mC*CAAGT ^m C ^m C ^m CT ^m C*A*G*G*G*	34.5	74.9
440	mC*T*A*mC*T*G ^m C ^m CAAGT ^m C ^m C ^m CT ^m C*A*G*G*	35.4	73.6
441	T*mC*T*A*mC*T*G ^m C ^m CAAGT ^m C ^m C ^m C*T ^m C*A*G*	65.7	84.0
442	T*T*mC*T*A*mCTG ^m C ^m CAAGT ^m C ^m C ^m C*T ^m C*A*	47.9	93.1
443	T*T*T*mC*T*A ^m CTG ^m C ^m CAAGT ^m C ^m C ^m C*T ^m C*	53.6	85.3
444	A*T*T*T*mC*T*A ^m CTG ^m C ^m CAAGT ^m C ^m C ^m C*mC*T*	72.4	100.6
445	G*A*T*T*T*mCTA ^m CTG ^m C ^m CAAG*T ^m C ^m C ^m C*	68.6	79.7
446	G*G*A*T*T*T ^m CTA ^m CTG ^m C ^m CAA*G*T ^m C ^m C*	72.1	88.6
447	T*G*G*A*T*TT ^m CTA ^m CTG ^m C ^m CA*A*G*T ^m C*	65.7	79.7
448	mC*T*G*G*A*TTT ^m CTA ^m CTG ^m C ^m C*A*A*G*T*	51.0	68.6
449	A*T*mC*T*T*AGG ^m CTGG ^m C ^m C ^m C*A*A*G*A*	43.6	74.1
450	T*G*A*T*mC*TTAGG ^m CTGG ^m C ^m C ^m C*A*A*	38.8	70.0
451	T*T*T*A*T*mCTG ^m C ^m CAG ^m CA ^m CT*G*A*T ^m C*	51.0	76.2
452	A*T*T*T*A*T ^m CTG ^m C ^m CAG ^m CA ^m C*T*G*A*T*	55.2	77.7
453	A*A*T*T*T*AT ^m CTG ^m C ^m CAG ^m CA ^m C*T*G*A*	68.1	71.1
454	T*A*T*A*T*mC ^m CTAT ^m CTAG ^m C ^m C ^m C*A ^m C ^m C*	60.1	88.2
455	G*T*A*T*A*T ^m C ^m CTAT ^m CTAG ^m C ^m C ^m C*A ^m C*	64.2	85.2
456	A*G*T*A*T*AT ^m C ^m CTAT ^m CTAG ^m C ^m C ^m C*A*	62.8	86.2
457	A*A ^m C ^m C ^m C ^m CAAGGG ^m C ^m CT ^m CT*A*A ^m C*T*	83.3	90.7
458	G ^m C*A*A ^m C ^m CAGATGT ^m C ^m CAT*A*T*T ^m C*	50.9	87.2
459	G*G ^m C*T*T*AGGA ^m C ^m C ^m C ^m CTGA*A*A*G*A*	59.8	71.1
460	G*G ^m C*A*T*GATTGTGGG ^m CT*T*A*G*G*	32.3	51.6
461	A*G*G ^m C*A*TGATTGTGGG ^m C*T*T*A*G*	31.0	60.2
462	G*T*A*A ^m C ^m C ^m CTTT ^m CAAAG ^m C*T*G*A*	50.2	63.6
463	G*G*T*A*A ^m C ^m C ^m CTTT ^m CAAA ^m G ^m C*T*G*	27.1	51.9
464	G*G*G*T*A*A ^m C ^m C ^m CTTT ^m CAA*A*G ^m C*T*	45.6	64.5
465	A*G*G*G*T*AA ^m C ^m C ^m CTTT ^m CA*A*A*G ^m C*	60.3	61.5
466	mC*A*G*G*G*TAA ^m C ^m C ^m CTTT ^m C*A*A*A*G*	59.2	82.8
467	mC ^m C*A*G*G*GTAA ^m C ^m C ^m CTTT ^m C*A*A*A*	48.5	57.9
468	mC ^m C ^m C*A*G*GGTAA ^m C ^m C ^m CTTT ^m T ^m C*A*A*	37.8	70.2
469	G ^m C ^m C ^m C*A*GGGTAA ^m C ^m C ^m CTT ^m T*T ^m C*A*	31.9	58.2
470	T*G ^m C*T ^m C*AA ^m CATGG ^m CAAA ^m C*T ^m C*A*	42.1	70.5
471	T ^m C ^m C*T*G ^m CT ^m CAA ^m CATGG ^m C*A*A*A ^m C*	45.2	77.7
472	G*T ^m C ^m C*T*G ^m CT ^m CAA ^m CATGG ^m C*A*A*A*	42.9	64.0

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

15. % de ARNm residual es el nivel de ARNm de tau en las células SH–SY5Y tratadas con una dosis única de 2000 nM de ASO de tau durante 24 horas en comparación con el nivel de ARNm de tau en células de control tratadas con PBS.

16. % de ARNm residual es el nivel de ARNm de tau en las células Huh7
5 tratadas con una única dosis de ASO de tau a 25 nM durante 48 horas en comparación con el nivel de ARNm de tau en las células de control tratadas con PBS.

Los gápmers que disminuyeron significativamente la expresión de ARNm de Tau en la Tabla 13 se seleccionaron y se evaluaron en células SH–SY5Y. Los
10 valores de IC50 de los gápmers 5–10–5 seleccionados con 5–metilcitosinas se determinaron en células SH–SY5Y como se describió anteriormente, y se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14: IC50 de gápmers 5–10–5 seleccionados con 5–metilcitosina en células SH–SY5Y.

SEQ ID NO	Secuencia ASO ¹⁷	IC50 (nM)
313	mC*mC*T*T*G*mCTmCAGGTmCAAmC*T*G*G*T*	1115
327	mC*T*G*mC*mC*TGTGGmCTmCmCAmC*G*A*A*mC*	844
329	G*T*mC*T*G*mCmCTGTGGmCTmCmC*A*mC*G*A*	481
330	mC*G*T*mC*T*GmCmCTGTGGmCTmC*mC*A*mC*G*	555
331	T*mC*G*T*mC*T*GmCmCTGTGGmCT*mC*mC*A*mC*	818
332	A*T*mC*G*T*mCTGmCmCTGTGGmC*T*mC*mC*A*	918
333	mC*A*T*mC*G*TmCTGmCmCTGTGG*mC*T*mC*mC*	981
334	A*mC*A*T*mC*GTmCTGmCmCTGTG*G*mC*T*mC*	608
335	G*A*mC*A*T*mCGTmCTGmCmCTGT*G*G*mC*T*	414
336	T*G*A*mC*A*TmCGTmCTGmCmCTG*T*G*G*mC*	393
338	G*T*T*G*A*mCATmCGTmCTGmCmC*T*G*T*G*	588
340	A*A*G*G*T*GAmCATmCGTmCT*G*mC*mC*T*	496
366	G*T*mC*mC*mC*AGGTmCTGmCAAA*G*T*G*G*	793
384	mC*mC*mC*A*mC*TmCTTGmCTGmCmCTG*G*A*mC*T*	810
385	T*mC*mC*mC*A*mCTmCTTGmCTGmCmCT*G*G*A*mC*	954
404	G*T*mC*A*mC*TmCTGGTGAATmC*mC*A*A*G*	12035
405	A*G*T*mC*A*mCTmCTGGTGAAT*mC*mC*A*A*	743
381	A*mC*T*mC*T*TGTGmCmCTGGA*mC*T*T*T*G*	2737

17. Los nucleótidos con * tienen una modificación 2'–O–MOE; los nucleótidos sin * son 2'–deoxinucleósidos; y ^mC representa 5–metilcitósina. Las uniones de internucleósido son fosforotioato.

5 **Ejemplo 11: Inhibición de la expresión de Tau de mono y humano por oligonucleótidos antisentido con 5–metilcitósina.**

Algunos gápmers que disminuyeron significativamente la expresión de ARNm de Tau se seleccionaron y se evaluaron en células de mono verde COS1. Los resultados se presentan como porcentaje de ARNm de Tau residual en relación con las células de control tratadas con PBS. La Tabla 15 muestra las actividades de gápmers 5–10–5 seleccionados en células COS1.

Tabla 15: Inhibición de ARNm de Tau de mono verde por gápmers 5–10–5 MOE en células Cos1.

SEQ ID NO	Secuencia ASO ¹⁸	% ARNm tau residual ¹⁹
284	^m C* ^m C*G*T*A* ^m CGT ^m C ^m C ^m CAG ^m CGT*G*A*T* ^m C*	61
473	^m C* ^m C* ^m C*G*T*A* ^m CGT ^m C ^m C ^m CAG ^m CG*T*G*A*T*	62
474	G*G* ^m C* ^m C*A*G ^m CGT ^m C ^m CGTGT ^m C*A* ^m C* ^m C* ^m C*	64
386	G*T* ^m C* ^m C* ^m C*A* ^m CT ^m CTTGTG ^m C ^m C*T*G*G*A*	53
335	G*A* ^m C*A*T* ^m CGT ^m CTG ^m C ^m CTGT*G*G* ^m C*T*	39
384	^m C* ^m C* ^m C*A* ^m C*T ^m CTTGTG ^m C ^m CTG*G*A* ^m C*T*	51
313	^m C* ^m C*T*T*G* ^m CT ^m CAGGT ^m CAAA ^m C*T*G*G*T*	37
366	G*T* ^m C* ^m C* ^m C*AGGT ^m CTG ^m CAAA*G*T*G*G*	35
329	G*T* ^m C*T*G* ^m C ^m CTGTGG ^m CT ^m C ^m C*A* ^m C*G*A*	34
405	A*G*T* ^m C*A* ^m CT ^m CTGGTGAAT* ^m C* ^m C*A*A*	37

15 18. Los nucleótidos con * tienen una modificación 2'–O–MOE; los nucleótidos sin * son 2'–desoxinucleósidos; y ^mC representa 5–metilcitósina. Las uniones de internucleósido son fosforotioato.

19. % ARNm residual es el nivel de ARNm de tau en las células Cos1 tratadas con una única dosis de 2000 nM de ASO de tau durante 24 horas en comparación con el nivel de ARNm de tau en células de control tratadas con PBS.

Se seleccionaron y se evaluaron algunos oligonucleótidos antisentido que disminuyeron significativamente la expresión de ARNm de Tau, en neuronas derivadas de células madre embrionarias humanas (hESC). Los resultados se presentan como porcentaje de ARNm de Tau residual en relación con las células de control tratadas con PBS. La Tabla 16 muestra las actividades de oligonucleótidos antisentido seleccionados en neuronas humanas.

Tabla 16: Inhibición de la expresión de Tau humana en neuronas derivadas de hESC por ASO de Tau seleccionados.

SEQ ID NO	Secuencia ASO ²⁰	% ARNm residual ²¹
475	mC*mC*A*T*G*mC*G*A*G*mC*T*G*A*T*A*A*A*	20.9
476	G*mC*A*T*mC*G*T*mC*A*G*mC*T*T*A*mC*mC*T*	40.0
477	mC*T*T*T*G*mC*T*T*T*T*A*mC*T*G*A*mC*mC*	16.2
478	T*mC*A*A*mC*T*G*G*T*T*T*G*T*A*G*A*mC*	34.9

20. Los nucleótidos con * tienen una modificación 2'–O–MOE; los nucleótidos sin * son 2'–desoxinucleósidos; y ^mC representa 5–metilcitosina. Las uniones de internucleósido son fosforotioato.

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

Ejemplo 12: Prueba *in vivo* de gámpmeros dirigidos a MAPT.

La actividad *in vivo* de gámpmeros 5–10–5 seleccionados se evaluó usando los métodos descritos en el Ejemplo 9. Como se muestra en la Tabla 17, algunos oligonucleótidos antisentido inhibieron significativamente la expresión de proteína y ARNm de tau humana en la corteza y el hipocampo.

5

Tabla 17: Inhibición de la expresión de ARNm y proteína de Tau por gápmeros 5–10–5 MOE *in vivo*.

SEQ ID NO	Dosis (ug)	Duración de tratamiento (semanas)	% ARNm tau residual luego de tratamiento ASO ²²		% Proteína tau residual luego de tratamiento ASO ²³	
			Corteza	Hipocampo	Corteza	Hipocampo
284	200	4	56	61	98	82
473	200	4	76	44	73	69
474	200	4	48	26	73	66
386	200	4	50	48	69	68
335	50	4	N/T ²⁴	76	N/T	103
384	50	4	N/T	65	N/T	111
313	50	4	N/T	98	N/T	144

10

22. % ARNm tau residual es el nivel de ARNm de tau en el tejido cerebral indicado de ratones transgénicos BAC hTau cuatro semanas después de una única inyección ICV del ASO indicado, en comparación con el nivel de ARNm de tau en el tejido cerebral correspondiente de los ratones transgénicos de control BAC hTau que no fueron tratados con ASO.

15

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

20

24. N/T significa no evaluado.

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el generalmente entendido por el especialista experto en el campo al que pertenece la divulgación.

A menos que se indique lo contrario, todos los métodos, las etapas, técnicas
5 y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle se pueden realizar y se han realizado de una manera conocida *per se*, como será claro para el experto. Por ejemplo, nuevamente se hace referencia a los manuales estándares y al estado de la técnica general mencionado en esta solicitud, y a las referencias adicionales citadas en este documento. A menos que se indique lo contrario, cada
10 una de las referencias citadas en este documento se incorpora en su totalidad por referencia.

Las reivindicaciones de la invención no son limitativas, y se proporcionan a continuación.

Si bien en la presente solicitud se han descrito en detalle aspectos
15 particulares y reivindicaciones, esto se ha realizado a modo de ejemplo solo con fines de ilustración, y no tiene el propósito de limitación con respecto al alcance de las reivindicaciones adjuntas, o el alcance del objeto del asunto de las reivindicaciones de cualquier solicitud futura correspondiente. En particular, los inventores contemplan que se pueden realizar diversas sustituciones, alteraciones
20 y modificaciones a la divulgación, sin apartarse del espíritu y alcance de la divulgación tal como se define en las reivindicaciones. La elección de material de partida de ácido nucleico, clon de interés o tipo de genoteca se considera una cuestión de rutina para un experto en la técnica con conocimiento de los aspectos descritos en este documento. Otros aspectos, ventajas y modificaciones se
25 consideran dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones. Los expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de determinar, usando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes de los aspectos específicos de la

invención descritos en este documento. Dichos equivalentes tienen el propósito de estar abarcados por las siguientes reivindicaciones. La reformulación del alcance reivindicatorio en solicitudes correspondientes presentadas posteriormente puede deberse a limitaciones de las leyes de patentes de diversos países, y no debe

5 interpretarse como una renuncia al objeto del asunto de las reivindicaciones.