

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393551 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.04.03

(22) Дата подачи заявки
2022.06.22

(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61K 31/7115 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)

(54) АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА PIKFYVE

(31) 63/202,717

(32) 2021.06.22

(33) US

(86) PCT/US2022/034539

(87) WO 2022/271836 2022.12.29

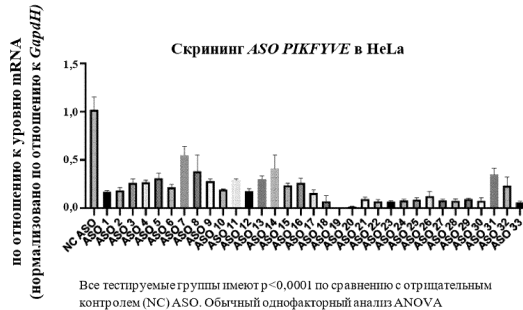
(88) 2023.02.09

(71) Заявитель:
АКУРАСТЕМ ИНКОРПОРЕЙТИД
(US)

(72) Изобретатель:
Чан Вэнь-Суань, Ли Эмили Элизабет
(US)

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

(57) Настоящее изобретение относится к антисмысловым олигонуклеотидам (ASO), нацеленным на PIKFYVE, фармацевтическим композициям, содержащим их, а также к способам лечения, ингибирования, подавления и предупреждения неврологических заболеваний с их помощью.



202393551

A1

A1

202393551

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580133EA/025

АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА PIKFYVE

[1] Настоящая заявка заявляет приоритет по заявке на патент США № 63/202717, поданной 22 июня 2021 г., которая включена в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[2] Настоящее изобретение относится к антисмысловым олигонуклеотидам (ASO), нацеленным на PIKFYVE, фармацевтическим композициям, содержащим их, а также к способам лечения, ингибирования, подавления и предупреждения неврологических или нейродегенеративных заболеваний с их помощью.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[3] Многие нейродегенеративные нарушения у пациентов сложно эффективно лечить, особенно если патология нейродегенеративного нарушения у конкретного пациента не до конца понятна.

[4] Международная публикация № WO 2016/210372 раскрывает способ лечения нейродегенеративного заболевания с помощью введения ингибитора PIKFYVE.

[5] Сохраняется потребность в эффективном лечении многих нейродегенеративных заболеваний, таких как боковой амиотрофический склероз (ALS) и лобно-височная деменция (FTD).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[6] Настоящее изобретение относится к антисмысловым олигонуклеотидам (ASO), нацеленным на PIKFYVE, фармацевтическим композициям, содержащим их, и их применению в лечении нейродегенеративных нарушений.

[7] Одним вариантом осуществления является одноцепочечный ASO, который подавляет экспрессию PIKFYVE, где ASO имеет последовательность нуклеиновых оснований, которая содержит по меньшей мере 12 или 15 последовательных нуклеиновых оснований любой из последовательностей нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1-500. Последовательность нуклеиновых оснований ASO может содержать до 30, 25, 24, 23, 22, 21 или 20 последовательных нуклеиновых оснований любой из последовательностей нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1-500. ASO также может представлять собой любую из SEQ ID NO: 1-500.

[8] Другой вариант осуществления представляет собой олигонуклеотид, состоящий из 12-30 связанных нуклеозидов и имеющий последовательность нуклеиновых оснований, содержащую по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19 или по меньшей мере 20 последовательных нуклеиновых оснований любой из последовательностей нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1-500. Олигонуклеотид может содержать до 25, 24, 23, 22, 21 или 20 последовательных нуклеиновых оснований любой из последовательностей нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1-500.

[9] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна межнуклеозидная связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь, и модифицированная межнуклеозидная связь может представлять собой тиофосфатную межнуклеозидную связь или фосфодиэфирную межнуклеозидную связь. По меньшей мере один из нуклеозидов также может представлять собой модифицированное нуклеиновое основание.

[10] В других вариантах осуществления по меньшей мере один нуклеозид ASO может представлять собой модифицированный сахарный фрагмент, где этот модифицированный сахарный фрагмент может представлять собой бициклический сахарный фрагмент, или модифицированный сахарный фрагмент может содержать 2'-О-метоксиэтильную группу. В определенных аспектах бициклический сахарный фрагмент содержит 4'-СН(Р)-О-2' мостик, где группа Р независимо представляет собой Н, С₁₋₁₂ алкил или защитную группу.

[11] В других вариантах осуществления ASO представляет собой гэдмер (например, гэдмер МОЕ), где гэдп-сегмент может состоять из 8-12 связанных дезоксинуклеозидов, сегмента 5'-крыла, состоящего из 3-5 связанных нуклеозидов, и сегмента 3'-крыла, состоящего из 3-5 связанных нуклеозидов. В определенных аспектах гэдп-сегмент может быть расположен между сегментом 5'-крыла и сегментом 3'-крыла, где нуклеозид каждого сегмента крыла содержит модифицированный сахарный фрагмент (например, фрагмент с 2'-О-метоксиэтильной группой).

[12] В других вариантах осуществления олигонуклеотид состоит из 12-30 связанных нуклеозидов и имеет последовательность нуклеиновых оснований, содержащую по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19 или по меньшей мере 20 последовательных нуклеиновых оснований любой из последовательностей нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1-500.

[13] Другой вариант осуществления представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую ASO, нацеленный на PIKFYVE, по настоящему изобретению и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей и/или вспомогательных веществ. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция является подходящей для парентерального введения, такого как интрацеребровентрикулярная инъекция или интратекальное введение.

[14] Еще одним вариантом осуществления является способ ингибирования, подавления или предупреждения экспрессии PIKFYVE у пациента (например, имеющего неврологическое или нейродегенеративное заболевание) с помощью введения пациенту (например, с помощью интрацеребровентрикулярной инъекции или интратекального введения) ASO, нацеленного на PIKFYVE, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе (например, ее эффективное количество).

[15] Еще одним вариантом осуществления является способ лечения субъекта,

имеющего неврологическое или нейродегенеративное заболевание, с помощью введения терапевтически эффективного количества ASO, нацеленного на PIKFYVE или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В одном варианте осуществления заболевание представляет собой боковой амиотрофический склероз (ALS) (например, C9orf72-ассоциированный ALS). В другом варианте осуществления заболевание представляет собой лобно-височную деменцию (FTD), такую как FTD с патологией TDP-43 или FTD с патологией тау-белка. В еще одном варианте осуществления заболевание представляет собой C9orf72-ассоциированную FTD (C9-FTD). В еще одном варианте осуществления заболевание представляет собой FTD с патологией накопления тау-белка, ассоциированного с микротрубочками (МАРТ) (МАРТ-FTD), например, FTD с мутацией V337M в гене МАРТ.

[16] Еще одним вариантом осуществления является способ лечения субъекта, имеющего заболевание или нарушение PIKFYVE, с помощью введения терапевтически эффективного количества ASO, нацеленного на PIKFYVE, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[17] Более полное понимание настоящего изобретения и многих сопутствующих ему преимуществ будет легко получено, поскольку оно станет лучше понято при обращении к следующему подробному описанию, рассмотренному в сочетании с сопровождающими фигурами, где:

[18] На фиг. 1 изображен скрининг ASO, нацеленного на *PIKFYVE*, в клетках HeLa, измеряющий относительные уровни экспрессии mRNA ASO 1-33 (SEQ ID NO: 1-33) по сравнению с контролем (NCASO).

[19] На фиг. 2 представлена гистограмма, изображающие супрессивный эффект различных ASO, нацеленных на *PIKFYVE*, у новорожденных трансгенных мышей *hPIKFYVE* BAC.

[20] На фиг. 3 представлены гистограммы, изображающие изменение mRNA *PIKFYVE* и белка *PIKFYVE* у отличных от человека приматов (NHP) при обработке и без обработки ASO-520 или искусственной спинномозговой жидкостью (aCSF).

[21] На фиг. 4A представлен график, изображающий процент выживаемости контрольных двигательных нейронов в присутствии некодирующего ASO (NC ASO) или полученных от пациента с C9ALS двигательных нейронов, в присутствии (i) NC ASO или (ii) AS-20 (SEQ ID NO: 20).

[22] На фиг. 4B представлена гистограмма, изображающая отношение рисков для контрольных двигательных нейронов в присутствии NC ASO или полученных от пациента с C9ALS двигательных нейронов, в присутствии (i) NC ASO или (ii) AS-520 (SEQ ID NO: 520).

[23] На фиг. 5A представлен график, изображающий вероятность выживания корковых нейронов, полученных от пациента с FTD, с МАРТ V337V или V337M в присутствии NC ASO или AS-520 (SEQ ID NO: 520).

[24] На фиг. 5B представлена гистограмма, изображающая соотношение рисков для корковых нейронов из контрольной группы, FTD, ассоциированной с C9orf72 (C9-FTD), спорадической FTD (sFTD) и FTD с патологией накопления тау-белка, ассоциированного с микротрубочками (МАРТ) (МАРТ-FTD) у пациентов, получавших лечение NC ASO или AS-520.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[25] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники. В случае противоречий преимущественную силу имеет настоящий документ, включая определения. Предпочтительные способы и материалы описаны ниже, хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего изобретения. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, включены в качестве ссылки во всей своей полноте. Материалы, способы и примеры, раскрытые в данном документе, являются только иллюстративными и не должны носить ограничительный характер. Терминология, используемая в данном документе, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не подразумевает ограничения.

[26] Определения

[27] Термины «содержать(ит)», «включать(ют)», «имеющий», «имеет», «способен», «содержать(ит)», «может» и их варианты, используемые в данном документе, предназначены для открытых переходных фраз, терминов или слов, которые не исключают возможности дополнительных действий или структур.

[28] Формы единственного числа включают ссылку на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

[29] Настоящее изобретение также предполагает другие варианты осуществления, «содержащие», «состоящие из» и «состоящие по сути из» вариантов осуществления или элементов, представленных в данном документе, независимо от того, изложены они явно или нет.

[30] Используемый в данном документе термин «2'-дезоксинуклеозид» означает нуклеозид, содержащий 2'-Н(Н) фуранозильный сахарный фрагмент, обнаруженный во встречающихся в природе дезоксирибонуклеиновых кислотах (ДНК), и нуклеиновое основание. В определенных вариантах осуществления 2'-дезоксинуклеозид может содержать модифицированное нуклеиновое основание и фуранозильный сахарный фрагмент или может содержать нуклеиновое основание РНК (урацил) и фуранозильный сахарный фрагмент.

[31] Используемый в данном документе термин «2'-замещенный нуклеозид» означает нуклеозид, содержащий 2'-замещенный сахарный фрагмент. Используемый в данном документе термин «2'-замещенный» по отношению к сахарному фрагменту

означает сахарный фрагмент, содержащий по меньшей мере одну группу 2'-заместителя, отличную от Н или ОН.

[32] Используемый в данном документе термин «антисмысловая молекула» означает олигомерную нуклеиновую кислоту или олигомерный дуплекс, способный проявлять по меньшей мере одну антисмысловую активность.

[33] Модификатор «около», используемый в связи с величиной, включает заявленное значение и имеет значение, продиктованное контекстом (например, он включает по меньшей мере степень ошибки, ассоциированной с измерением конкретной величины). Модификатор «около» также следует рассматривать как раскрывающий диапазон, определяемый абсолютными значениями двух конечных точек. Например, выражение «от около 2 до около 4» также раскрывает диапазон «от 2 до 4». Термин «около» может относиться к плюс или минус 10% от указанного числа. Например, «около 10%» может обозначать диапазон от 9% до 11%, а «около 1» может означать диапазон от 0,9 до 1,1. Другие значения слова «около» могут быть очевидны из контекста, например, округление, так, например, «около 1» может также означать от 0,5 до 1,4.

[34] Для перечисления числовых диапазонов в данном документе явно рассматривается каждое промежуточное число между ними с одинаковой степенью точности. Например, для диапазона 6-9 помимо 6 и 9 предполагаются цифры 7 и 8, а для диапазона 6,0-7,0 - числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0 явно предусмотрены.

[35] Используемый в данном документе термин «бициклический сахар» или «бициклический сахарный фрагмент» означает модифицированный сахарный фрагмент, содержащий два кольца, причем второе кольцо образовано через мостик, соединяющий два атома в первом кольце, тем самым образуя бициклическую структуру. В определенных вариантах осуществления первое кольцо бициклического сахарного фрагмента представляет собой фуранозильный фрагмент. В определенных вариантах осуществления бициклический сахарный фрагмент не содержит фуранозильный фрагмент. Используемый в данном документе термин «бициклический нуклеозид» или «BNA» означает нуклеозид, содержащий бициклический сахарный фрагмент.

[36] Используемый в данном документе термин «хирально обогащенная популяция» означает множество молекул с идентичной молекулярной формулой, где количество или процент молекул в популяции, которые содержат конкретную стереохимическую конфигурацию в конкретном хиральном центре, больше, чем количество или процент молекул, которые, как ожидается, будут содержать одну и ту же конкретную стереохимическую конфигурацию в одном и том же конкретном хиральном центре в популяции, если конкретный хиральный центр является стереослучайным. Хирально обогащенные популяции молекул, имеющие множество хиральных центров внутри каждой молекулы, могут содержать один или более стереослучайных хиральных центров. В определенных вариантах осуществления молекулы представляют собой модифицированные олигонуклеотиды. В определенных вариантах осуществления

молекулы представляют собой соединения, содержащие модифицированные олигонуклеотиды.

[37] Используемый в данном документе термин «комплементарный» по отношению к олигонуклеотиду означает, что по меньшей мере 70% нуклеиновых оснований олигонуклеотида или одного или более его областей и нуклеиновых оснований другой нуклеиновой кислоты или одной или нескольких (EV) областей могут образовывать водородные связи друг с другом, когда последовательность нуклеиновых оснований олигонуклеотида и другой нуклеиновой кислоты выровнены в противоположных направлениях. Комплементарные нуклеиновые основания означают нуклеиновые основания, способные образовывать водородные связи друг с другом. Дополнительные пары нуклеиновых оснований включают аденин (A) и тимин (T); аденин (A) и урацил (U); цитозин (C) и гуанин (G); и 5-метилцитозин (mC) и гуанин (G). Комплементарные олигонуклеотиды и/или нуклеиновые кислоты не обязательно должны иметь комплементарность нуклеиновых оснований по каждому нуклеозиду. Скорее допускаются некоторые несоответствия. Используемый в данном документе термин «полностью комплементарный» или «100% комплементарный» в отношении олигонуклеотидов означает, что олигонуклеотиды комплементарны другому олигонуклеотиду или нуклеиновой кислоте по каждому нуклеозиду олигонуклеотида.

[38] Используемый в данном документе термин «гэпмер» означает модифицированный олигонуклеотид, содержащий внутреннюю область, имеющую множество нуклеозидов, которые поддерживает расщепление РНКазой H, расположенную между внешними областями, содержащими один или более нуклеозидов, где содержащиеся во внутренней области нуклеозиды химически отличаются от нуклеотида или нуклеозидов, которые содержатся во внешних областях. Внутренняя область может называться «гэп», а внешние области могут называться «крыльями». Если не указано иное, «гэпмер» относится к сахарному мотиву. Если не указано иное, сахарные фрагменты нуклеозидов гэпа гэпмера представляют собой немодифицированный 2'-дезоксифуранозил. Таким образом, термин «МОЕ-гэпмер» обозначает гэпмер, имеющий сахарный мотив из 2'-МОЕ-нуклеозидов в обоих крыльях и гэп из 2'-дезоксинуклеозидов. Если не указано иное, МОЕ-гэпмер может содержать одну или более модифицированных межнуклеозидных связей и/или модифицированных нуклеиновых оснований, и такие модификации не обязательно соответствуют структуре гэпмеров модификаций сахара. В таблице 2 ниже представлены иллюстративные МОЕ-гэпмеры.

[39] В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды содержат один или более типов модифицированных сахарных фрагментов и/или немодифицированных сахарных фрагментов, расположенных вдоль олигонуклеотида или его области определенным образом или в виде сахарного мотива. В определенных случаях, такие мотивы могут содержать без ограничения любые сахарные модификации, рассмотренные в данном документе и/или другие известные модификации сахара.

[40] В определенных вариантах осуществления модифицированные

олигонуклеотиды содержат или состоят из области, имеющей гэтамерный мотив, который определяется с помощью двух внешних областей или «крыльев» и центральной или внутренней области, или «гэта». Три области гэтамерного мотива включают «5'-крыло», «гэта» и «3'-крыло», которые образуют непрерывную последовательность нуклеозидов, в которой по меньшей мере некоторые сахарные фрагменты нуклеозидов каждого из крыльев различаются от по меньшей мере некоторых сахарных фрагментов нуклеозидов гэта. В частности, по меньшей мере те сахарные фрагменты нуклеозидов каждого крыла, которые расположены ближе всего к гэтапу (крайний 3'-концевой нуклеозид 5'-крыла и крайний 5'-концевой нуклеозид 3'-крыла), отличаются от сахарного фрагмента соседних нуклеозидов в гэтае, определяя таким образом границу между крыльями и гэтапом (т.е. соединение крыло/гэта). В определенных вариантах осуществления сахарные фрагменты в пределах гэта являются одинаковыми друг по отношению к другу. В определенных вариантах осуществления гэта включает один или более нуклеозидов, имеющих сахарный фрагмент, который отличается от сахарного фрагмента одного или более других нуклеозидов гэта. В определенных вариантах осуществления сахарные мотивы двух крыльев являются одинаковыми (симметричный гэтамер). В определенных вариантах осуществления сахарный мотив 5'-крыла отличается от сахарного мотива 3'-крыла (асимметричный гэтамер).

[41] В определенных вариантах осуществления крылья гэтамера содержат 1-5 нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления каждый нуклеозид каждого крыла гэтамера представляет собой модифицированный нуклеозид.

[42] В определенных вариантах осуществления гэта гэтамера содержит 7-12 нуклеозидов (например, 10 нуклеозидов). В определенных вариантах осуществления каждый нуклеозид гэта гэтамера представляет собой немодифицированный 2'-дезоксинуклеозид.

[43] В определенных вариантах осуществления гэтамер представляет собой дезокси-гэтамер. В вариантах осуществления нуклеозиды на стороне гэта каждого крыла/соединения гэта представляют собой немодифицированные 2'-дезоксинуклеозиды, а нуклеозиды на сторонах гэта каждого крыла/соединения гэта представляют собой модифицированные нуклеозиды. В определенных вариантах осуществления каждый нуклеозид гэта представляет собой немодифицированный 2'-дезоксинуклеозид. В определенных вариантах осуществления каждый нуклеозид каждого крыла гэтамера представляет собой модифицированный нуклеозид.

[44] В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат или состоят из области, имеющей полностью модифицированный сахарный мотив. В таких вариантах осуществления каждый нуклеозид полностью модифицированной области модифицированного олигонуклеотида содержит модифицированный сахарный фрагмент. В определенных вариантах осуществления каждый нуклеозид всего модифицированного олигонуклеотида содержит модифицированный сахарный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления

модифицированные олигонуклеотиды содержат или состоят из области, имеющей полностью модифицированный сахарный мотив, где каждый нуклеозид в полностью модифицированной области содержит один и тот же модифицированный сахарный фрагмент, обозначаемый в данном документе равномерно модифицированным сахарным мотивом. В определенных вариантах осуществления полностью модифицированный олигонуклеотид представляет собой равномерно модифицированный олигонуклеотид. В определенных вариантах осуществления каждый нуклеозид однородно модифицированного олигонуклеотида содержит одинаковую 2'-модификацию.

[45] Термин «ингибировать», используемый в данном документе, относится к способности существенно антагонизировать, запрещать, предупреждать, подавлять, сдерживать, замедлять, разрушать, изменять, устранять, останавливать или обращать прогрессирование или тяжесть активности конкретного агента (например, инфекционного агента) или заболевания.

[46] Используемый в данном документе термин «межнуклеозидная связь» означает ковалентную связь между соседними нуклеозидами в олигонуклеотиде. Используемый в данном документе термин «модифицированная межнуклеозидная связь» означает любую межнуклеозидную связь, отличную от фосфодиэфирной межнуклеозидной связи. «Фосфоротионатная связь» представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь, в которой один из немостиковых атомов кислорода фосфодиэфирной межнуклеозидной связи замещен атомом серы.

[47] В определенных вариантах осуществления нуклеозиды модифицированных олигонуклеотидов могут быть связаны друг с другом с использованием любой межнуклеозидной связи. Два основных класса межнуклеозидных связывающих групп определяются наличием или отсутствием атома фосфора. Типичные фосфорсодержащие межнуклеозидные связи включают без ограничения фосфаты, которые содержат фосфодиэфирную связь (также обозначаемые немодифицированными или встречающимися в природе связями), фосфотриэфиры, метилфосфонаты или другие алкилфосфонаты, фосфорамидаты, фосфоротиоаты и фосфородитиоаты. Типичные нефосфорсодержащие межнуклеозидные связывающие группы, включают без ограничения метилениметилимино ($-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$), сложный тиоэфир, тионокарбамат ($-\text{O}-\text{C}(=\text{O})(\text{NH})-\text{S}-$); силоксан ($-\text{O}-\text{SiH}_2-\text{O}-$); и N, N'-диметилгидразин ($-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-$). Модифицированные межнуклеозидные связи по сравнению с встречающимися в природе фосфатными связями можно использовать для изменения, обычно повышения нуклеазной устойчивости олигонуклеотида. Способы получения фосфорсодержащих и нефосфорсодержащих межнуклеозидных связей хорошо известны специалистам в данной области техники.

[48] Типичные межнуклеозидные связи, имеющие хиральный центр, включают без ограничения алкилфосфонаты и фосфоротиоаты. Модифицированные олигонуклеотиды, содержащие межнуклеозидные связи, имеющие хиральный центр, могут быть получены в виде популяций модифицированных олигонуклеотидов, содержащих стереослучайные

межнуклеозидные связи, или в виде популяций модифицированных олигонуклеотидов, содержащих фосфоротиоатные связи в определенных стереохимических конфигурациях. В определенных вариантах осуществления популяции модифицированных олигонуклеотидов содержат фосфоротиоатные межнуклеозидные связи, где все фосфоротиоатные межнуклеозидные связи являются стереослучайными. Такие модифицированные олигонуклеотиды можно получить с помощью методов синтеза, которые приводят к случайному выбору стереохимической конфигурации каждой фосфоротиоатной связи. Тем не менее, как хорошо понятно специалистам в данной области техники, каждый отдельный фосфоротиоат каждой отдельной молекулы олигонуклеотида имеет определенную стереоконфигурацию. В некоторых вариантах осуществления популяции модифицированных олигонуклеотидов обогащены модифицированными олигонуклеотидами, содержащими одну или более конкретных фосфоротиоатных межнуклеозидных связей в конкретной, независимо выбранной стереохимической конфигурации. В определенных вариантах осуществления определенная конфигурация определенной фосфоротиоатной связи присутствует в по меньшей мере 65% молекул в популяции. В определенных вариантах осуществления определенная конфигурация определенной фосфоротиоатной связи присутствует в по меньшей мере 70% молекул в популяции. В определенных вариантах осуществления определенная конфигурация определенной фосфоротиоатной связи присутствует в по меньшей мере 80% молекул в популяции. В определенных вариантах осуществления определенная конфигурация определенной фосфоротиоатной связи присутствует в по меньшей мере 90% молекул в популяции. В определенных вариантах осуществления определенная конфигурация определенной фосфоротиоатной связи присутствует в по меньшей мере 99% молекул в популяции. Такие хирально обогащенные популяции модифицированных олигонуклеотидов могут быть получены с использованием способов синтеза, известных в данной области техники, например, способов, описанных в Oka *et al.*, *JACS* 125, 8307 (2003); Wan *et al.*, *Nuc. Acid. Res.* 42, 13456 (2014); Chapter 10 of *Locked Nucleic Acid Aptamers in Nucleic Acid and Peptide Aptamers: Methods and Protocols* v 535, 2009 by Barciszewski *et al.*, editor Gunter Mayerand; и WO 2017/015555. В определенных вариантах осуществления популяцию модифицированных олигонуклеотидов обогащают модифицированными олигонуклеотидами, имеющими по меньшей мере один указанный фосфоротиоат в (Sp) конфигурации. В другом варианте осуществления популяцию модифицированных олигонуклеотидов обогащают модифицированными олигонуклеотидами, имеющими по меньшей мере один указанный фосфоротиоат в (Rp) конфигурации.

[49] Используемый в данном документе термин «МОЕ» означает метоксиэтил. «2'-МОЕ» означает $-OCH_2CH_2OCH_3$ группу в 2'-положении фуранозильного кольца.

[50] «Неврологическое заболевание» представляет собой любое заболевание, которое вызывает электрические, биохимические или структурные аномалии в головном мозге, позвоночнике или нейронах. Например, неврологическое заболевание может

представлять собой нейродегенеративное заболевание. Нейродегенеративное заболевание может привести, например, к дегенерации двигательных нейронов. Неврологическим заболеванием может быть, например, боковой амиотрофический склероз (ALS), болезнь Хантингтона, болезнь Альцгеймера или лобно-височная деменция. Дополнительные примеры неврологических заболеваний включают без ограничения болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, периферическую миопатию, энцефалит Расмуссена, синдром дефицита внимания с гиперактивностью, аутизм, центральные болевые синдромы, тревожность и/или депрессию, в качестве примера.

[51] Неврологическое заболевание может быть ассоциировано с абберантным эндосомальным транспортом. Например, эндосомальные пути и эндосомы являются необходимыми компонентами для рециркуляции или разрушения мембраносвязанных белков, транспортировки белков, ассоциированных с аппаратом Гольджи, и внеклеточного высвобождения белков в экзосомах. Эти процессы способствуют нейротрансмиссии и обеспечивают баланс между рециркуляцией и деградацией синаптических везикул или рецепторов нейромедиаторов, в качестве примера.

[52] Неврологическое заболевание может быть ассоциировано с абберантной деградацией лизосом. Изменения в деградации лизосом могут присутствовать при неврологическом заболевании, таком как нейродегенеративное заболевание. Дисбаланс катепсина при старении и возрастных заболеваниях может вызывать вредное воздействие на нейроны центральной нервной системы (ЦНС), а лизосомы могут быть участками разворачивания и частичной деградации мембранных белков или их предшественников, которые впоследствии выводятся из клетки или высвобождаются из мертвых клеток и накапливаются в виде патологических образований.

[53] Медицинский работник может диагностировать у субъекта заболевание, ассоциированное с дегенерацией двигательных нейронов, с помощью оценки одного или более симптомов дегенерации двигательных нейронов. Для диагностики неврологического заболевания за физическим осмотром может последовать тщательное неврологическое обследование. С помощью неврологического обследования можно оценить двигательные и сенсорные навыки, нервную функцию, слух и речь, зрение, координацию и равновесие, психическое состояние, а также изменения в настроении или поведении. Неограничивающими симптомами заболевания, ассоциированного с неврологическим заболеванием, могут быть слабость в руках, ногах, ступнях или лодыжках; невнятность речи; трудности с подъемом передней части стопы и пальцев ног; слабость или неловкость рук; мышечный паралич; ригидность мышц; непроизвольные подергивания или пишущие движения (хорея); непроизвольная, стойкая контрактура мышц (дистония); брадикинезия; потеря автоматических движений; нарушение осанки и равновесия; отсутствие гибкости; покалывание частей тела; ощущения поражения электрическим током, возникающие при движении головы; подергивание рук, плеч и языка; трудность глотания; затрудненное дыхание; трудности с жеванием; частичная или полная потеря зрения; двоение в глазах; медленные или аномальные движения глаз;

тремор; нетвердая походка; усталость; потеря памяти; головокружение; трудности с мышлением или концентрацией внимания; трудности с чтением или письмом; неправильное толкование пространственных отношений; дезориентация; депрессия; беспокойство; трудности с принятием решений и суждений; потеря импульсного контроля; трудности в планировании и выполнении привычных задач; агрессивность; раздражительность; социальная изоляция; перепады настроения; деменция; изменение привычек сна; блуждание; и изменение аппетита.

[54] Тесты можно проводить для выявления заболеваний и нарушений, которые могут иметь симптомы, сходные с симптомами неврологических заболеваний, измерения поражения мышц, оценки дегенерации нейронов. Неограничивающими примерами тестов являются электромиография (EMG); исследование скорости нервной проводимости; лабораторные анализы крови, мочи или других веществ; магнитно-резонансная томография (MRI); магнитно-резонансная спектроскопия; биопсия мышц или нервов; транскраниальная магнитная стимуляция; генетический скрининг; рентген; рентгеноскопия; ангиография; компьютерная томография (СТ); позитронно-эмиссионная томография; анализ спинномозговой жидкости; интратекальная СТ с контрастным усилением; электроэнцефалография; электронистагмография; вызванный потенциал; полисомнограмма; термография; и ультразвуковое исследование. Медицинский работник также может оценить семейный анамнез пациента по заболеваниям, ассоциированным с дегенерацией двигательных нейронов, и поставить диагноз, частично основываясь на семейном анамнезе неврологических заболеваний. Медицинский работник может диагностировать заболевание, ассоциированное с неврологическим заболеванием, у субъекта после появления одного или более симптомов.

[55] Нейродегенеративные заболевания приводят к прогрессирующему разрушению нейронов, что влияет на передачу нейронных сигналов. Например, нейродегенерация может представлять собой боковой амиотрофический склероз, болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, атаксию Фридрейха, болезнь телец Леви, болезнь Паркинсона, атрофию спинальных мышц, первичный боковой склероз, прогрессирующую мышечную атрофию, прогрессирующий бульбарный паралич и псевдобульбарный паралич.

[56] Заболевания, ассоциированные с дегенерацией двигательных нейронов, могут представлять собой состояние, которое приводит к прогрессирующему разрушению двигательных нейронов, что мешает передаче сигналов нейронов мышцам, что приводит к мышечной слабости и истощению. У здоровых индивидуумов верхние двигательные нейроны передают сигналы от головного мозга к нижним двигательным нейронам ствола головного мозга и спинного мозга, которые затем передают сигнал мышцам, что приводит к произвольной мышечной активности. Разрушение верхних и нижних двигательных нейронов влияет на такую деятельность, как дыхание, разговор, глотание и ходьба, и со временем эти функции могут быть утрачены. Примеры заболеваний двигательных нейронов включают без ограничения боковой амиотрофический склероз, первичный

боковой склероз, прогрессирующую мышечную атрофию, прогрессирующий бульбарный паралич и псевдобульбарный паралич.

[57] Гипервозбудимость нейронов может возникнуть, когда рецепторы возбуждающего нейромедиатора глутамата (глутаматные рецепторы), такие как рецептор NMDA и рецептор AMPA, чрезмерно активируются избытком глутамата или другими соединениями или нейромедиаторами, действующими на глутаматные рецепторы. Эксайтотоксичность может быть результатом гипервозбудимости нейронов. Эксайтотоксичность представляет собой патологический процесс, при котором нервные клетки повреждаются или погибают в результате избыточной стимуляции. Чрезмерная стимуляция позволяет высокому уровню ионов кальция (Ca^{2+}) проникнуть в клетку. Приток Ca^{2+} в клетки активирует ряд ферментов, включая фосфолипазы, эндонуклеазы и протеазы, такие как кальпаин. Эти ферменты могут повреждать клеточные структуры, такие как компоненты цитоскелета, мембраны и ДНК.

[58] Гипервозбудимость нейронов может быть связана с повреждением спинного мозга, инсультом, черепно-мозговой травмой, потерей слуха (вследствие избыточного воздействия шума или ототоксичности), эпилепсией, болезненными нейропатиями, синдромом дефицита внимания и гиперактивности, аутизмом, центральными болевыми синдромами, нейродегенеративными заболеваниями, рассеянным склерозом, болезнью Альцгеймера, боковым амиотрофическим склерозом (ALS), болезнью Паркинсона, лобно-височной деменцией, шизофренией, энцефалитом Расмуссена, болезнью Хантингтона, алкоголизмом или алкогольной абстиненцией и особенно сверхбыстрой бензодиазепиновой абстиненцией, а также болезнью Хантингтона. Другими распространенными состояниями, которые вызывают избыточную концентрацию глутамата вокруг нейронов, являются гипогликемия. Уровень сахара в крови является основным методом удаления глутамата из межсинаптических пространств в сайтах рецепторов NMDA и AMPA.

[59] Используемый в данном документе термин «небициклический модифицированный фрагмент сахара» означает модифицированный сахарный фрагмент, который содержит модификацию, такую как заместитель, который не образует мостик между двумя атомами сахара с образованием второго кольца.

[60] Используемый в данном документе термин «нуклеиновое основание» означает немодифицированное нуклеиновое основание или модифицированное нуклеиновое основание. Используемый в данном документе термин «немодифицированное нуклеиновое основание» представляет собой аденин (A), тимин (T), цитозин (C), урацил (U) или гуанин (G). Используемый в данном документе термин «модифицированное нуклеиновое основание» представляет собой группу атомов, отличных от немодифицированных A, T, C, U или G, способных образовывать пары с по меньшей мере одним немодифицированным нуклеиновым основанием или модифицированным нуклеиновым основанием. «5-Метилцитозин» или «mC» представляет собой модифицированное нуклеиновое основание. Универсальное основание представляет

собой модифицированное нуклеиновое основание, которое может образовывать пары с любым из пяти немодифицированных нуклеиновых оснований. Используемый в данном документе термин «последовательность нуклеиновых оснований» означает порядок смежных нуклеиновых оснований в нуклеиновой кислоте или олигонуклеотиде независимо от какой-либо модификации сахара или межнуклеозидной связи.

[61] В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат один или более нуклеозидов, содержащих немодифицированное нуклеиновое основание. В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат один или более нуклеозидов, содержащих модифицированное нуклеиновое основание. В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат один или более нуклеозидов, которые не содержат нуклеиновое основание, называемые нуклеозидом с удаленным нуклеиновым основанием.

[62] В определенных вариантах осуществления модифицированные нуклеиновые основания выбраны из: 5-замещенных пиримидинов, 6-азапиримидинов, алкил- или алкинилзамещенных пиримидинов, алкилзамещенных пуринов и N-2, N-6 и O-6 замещенных пуринов. В определенных вариантах осуществления модифицированные нуклеиновые основания выбраны из: 2-аминопропиладенина, 5-гидроксиметилцитозина, ксантина, гипоксантина, 2-аминоаденина, 6-N-метиладенина, 2-пропиладенина, 2-тиоурацила, 2-тиотимина и 2-тиоцитозина, 5-пропинил(-C≡C-CH₃)урацила, 5-пропинилцитозина, 6-азоурацила, 6-азоцитозина, 6-азотимина, 5-рибозилурацила (псевдоурацила), 4-тиоурацила, 8-галогена, 8-амино, 8-тиола, 8-тиоалкила, 8-гидроксила, 8-аза и других 8-замещенных пуринов, 5-галогена, в частности, 5-брома, 5-трифторметила, 5-галогенурацила и 5-галогенцитозина, 7-метилгуанина, 7-метиладенина, 2-F-аденина, 2-аминоаденина, 7-дезагуанина, 7-дезааденина, 3-дезагуанина, 3-дезааденина, 6-N-бензоладенина, 2-N-изобутирилгуанина, 4-N-бензоилцитозина, 4-N-бензоилурацила, 5-метил-4-N-бензоилцитозина, 5-метил-4-N-бензоилурацила, универсальных оснований, гидрофобных оснований, смешанных оснований, увеличенных в размере оснований и фторсодержащих оснований. Дополнительные модифицированные нуклеиновые основания включают трициклические пиримидины, такие как 1,3-диазафеноксазин-2-он, 1,3-диазафенотиазин-2-он и 9-(2-аминоэтоксид)-1,3-диазафеноксазин-2-он (G-фиксирующее основание). Пуриновые или пиримидиновые основания модифицированных нуклеиновых оснований могут быть заменены другими гетероциклами, например 7-дезааденином, 7-дезагуанозиним, 2-аминопиридином и 2-пиридоном. Дополнительные нуклеиновые основания включают раскрытые в патенте США № 3687808, раскрытые в *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, Kroschwitz, J. I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858-859; *Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613; *Sanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications*, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993, 273-288; и раскрытые в главах 6 и 15, *Antisense Drug Technology*, Crooke S. T., Ed., CRC Press, 2008, 163-166 and 442-443.

[63] Используемый в данном документе термин «нуклеозид» означает соединение, содержащее нуклеиновое основание и сахарный фрагмент. Нуклеиновое основание и сахарный фрагмент, каждый независимо, являются немодифицированными или модифицированными. Используемый в данном документе термин «модифицированный нуклеозид» означает нуклеозид, содержащий модифицированное нуклеиновое основание и/или модифицированный сахарный фрагмент. Модифицированные нуклеозиды включают нуклеозиды, в которых отсутствует нуклеиновое основание. «Связанные нуклеозиды» представляют собой нуклеозиды, которые соединены в непрерывную последовательность (т.е. между связанными нуклеозидами отсутствуют дополнительные нуклеозиды).

[64] Используемый в данном документе термин «олигомерное соединение» означает олигонуклеотид и необязательно один или более дополнительных элементов, таких как конъюгатная группа или концевая группа. Олигомерное соединение может быть спарено со вторым олигомерным соединением, которое комплементарно первому олигомерному соединению или может быть не спарено. «Одноцепочечное олигомерное соединение» представляет собой неспаренное олигомерное соединение. Термин «олигомерный дуплекс» означает дуплекс, образованный двумя олигомерными соединениями, имеющими комплементарные последовательности нуклеиновых оснований. Каждое олигомерное соединение олигомерного дуплекса может обозначаться «дуплексным олигомерным соединением».

[65] Используемый в данном документе термин «олигонуклеотид» означает нить связанных нуклеозидов, соединенных посредством межнуклеозидных связей, где каждый нуклеозид и межнуклеозидная связь могут быть модифицированными или немодифицированными. Межнуклеозидные связи могут быть любыми, описанными в данном документе. Если не указано иное, олигонуклеотиды состоят из 8-50 связанных нуклеозидов. Используемый в данном документе термин «модифицированный олигонуклеотид» означает олигонуклеотид, где по меньшей мере один нуклеозид или межнуклеозидная связь модифицированы. Используемый в данном документе термин «немодифицированный олигонуклеотид» означает олигонуклеотид, который не содержит каких-либо модификаций нуклеозидов или модификаций межнуклеозидных связей.

[66] «PIKFYVE», также известная в данной области техники как «фосфатидилинозитол-3-фосфат 5-киназа типа III» или «PIPKIII», представляет собой фосфоинозитидкиназу, содержащую палец FYVE, кодируемую геном *PIKFYVE*. PIKFYVE является высокоэволюционно консервативной липидкиназой, а также обладает протеинкиназной активностью, которая регулирует эндомембранный гомеостаз и играет роль в биогенезе везикул-носителей эндосом из ранних эндосом. PIKFYVE-опосредованное превращение PIP в PI(3,5)P₂ блокирует рекрутинг белка EEA1. Рекрутинг блокируется, поскольку PIP3 необходим для формирования платформы с RAB5, которая позволяет закрепить EEA1 на ранних эндосомах. Затем EEA1 приводит к слиянию с эндоцитическими и другими эндосомальными везикулами.

[67] Используемый в данном документе термин «заболевание или нарушение РИКFYVE» включает заболевания и нарушения лизосомального расщепления, опосредованные РИКFYVE. Например, заболевание или нарушение РИКFYVE включает без ограничения амилоидные заболевания (такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, диабет 2 типа, диабетический амилоидоз и хронический амилоид, связанный с гемодиализом), рассеянный склероз и нарушение MPS (такое как MPS I, MPS II, MPS IIIA, MPS IIIB, MPS IIIC, MPS IIID, MPS IVA, MPS IVB, MPS VI, MPS VII или MPS IX). В некоторых вариантах осуществления заболевания представляют собой аутоиммунные нарушения (такие как рассеянный склероз, ревматоидный артрит, ювенильный хронический артрит, анкилозирующий спондилит, псориаз, псориатический артрит, болезнь Стилла у взрослых, синдром Бехчета, семейная средиземноморская лихорадка, болезнь Крона, проказа, остеомиелит, туберкулез, хронические бронхоэктазы, болезнь Кастлемана) или нарушения ЦНС (такие как губчатые энцефалопатии (Крейцфельда-Якоба, куру, коровье бешенство)). Композиции и способы по настоящему изобретению можно применять для лечения индивидуумов с лизосомальными болезнями накопления, включающие введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества ASO РИКfyve или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления ASO и композиции по настоящему изобретению снижают или ингибируют активность РИКfyve и изменяют биогенез, функцию или динамику эндосомальных или лизосомальных систем таким образом, что снижается количество материала, аномально хранящегося в лизосоме при лизосомальных болезнях накопления. В некоторых вариантах осуществления ASO и композиции нацелены на РИКfyve, снижают или ингибируют его активность, таким образом изменяя биогенез, функции или динамику эндоплазматического ретикулума или аппарата Гольджи таким образом, что снижается количество материала, аномально хранящегося в лизосомах при лизосомальных болезнях накопления. В других вариантах осуществления заболевание представляет собой неврологическое нарушение.

[68] Используемый в данном документе термин «сахарный фрагмент» означает немодифицированный сахарный фрагмент или модифицированный сахарный фрагмент. Надстрочный штрих (') используется для описания нумерации сахара в нуклеозиде или нуклеотиде (положения нуклеиновых оснований нумеруются без штриха). При описании только сахара штрих не используется. Используемый в данном документе термин «немодифицированный сахарный фрагмент» означает 2-ОН(Н) фуранозильный фрагмент, обнаруженный в РНК («немодифицированный сахарный фрагмент РНК»), или 2-Н(Н) фрагмент, обнаруженный в ДНК («немодифицированный сахарный фрагмент ДНК»). Немодифицированные сахарные фрагменты содержат по одному водороду в каждом из положений 1, 3 и 4, кислород в положении 3 и два водорода в положении 5. Используемый в данном документе термин «модифицированный сахарный фрагмент» или «модифицированный сахар» означает модифицированный фуранозильный сахарный фрагмент или заменитель сахара. Используемый в данном документе модифицированный

фуранозильный сахарный фрагмент означает фуранозильный сахар, содержащий неводородный заместитель вместо по меньшей мере одного водорода в немодифицированном сахарном фрагменте. В определенных вариантах осуществления модифицированный фуранозильный сахарный фрагмент представляет собой 2-замещенный сахарный фрагмент. Такие модифицированные фуранозильные сахарные фрагменты включают бициклические сахара и небициклические сахара.

[69] В определенных вариантах осуществления модифицированные сахарные фрагменты представляют собой небициклические модифицированные сахарные фрагменты, содержащие фуранозильное кольцо с одной или более группами заместителей, ни одна из которых не связывает два атома фуранозильного кольца с образованием бициклической структуры. Такие немостиковые заместители могут находиться в любом положении фуранозила, включая без ограничения заместители в положениях 2, 4 и/или 5. В определенных вариантах осуществления один или более немостиковых заместителей небициклических модифицированных сахарных фрагментов являются разветвленными. Примеры групп 2-заместителей, подходящих для небициклических модифицированных сахарных фрагментов, включают без ограничения: 2-F, 2-OCH₃ («ОМе» или «О-метил») и 2-O(CH₂)₂OCH₃ («МОЕ»). В определенных вариантах осуществления группы 2-заместителей выбраны из: галогена, аллила, amino, азидо, SH, CN, OCN, CF₃, OCF₃, O-C₁₋₁₀ алкокси, O-C₁₋₁₀ замещенного алкокси, O-C₁₋₁₀ алкила, O-C₁₋₁₀ замещенного алкила, S-алкила, N(R_m)-алкила, O-алкенила, S-алкенила, N(R_m)-алкенила, O-алкинила, S-алкинила, N(R_m)-алкинила, O-алкиленил-O-алкила, алкинила, алкарила, аралкила, O-алкарила, O-аралкила, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂ON(R_m)(R_n) или OCH₂C(=O)-N(R_m)(R_n), где каждый R_m и R_n независимо представляет собой H, аминозащитную группу или замещенный или незамещенный C₁₋₁₀ алкил, а группы 2-заместителей могут быть дополнительно замещены одной или более группами заместителей, независимо выбранными из: гидроксила, amino, алкокси, карбокси, бензила, фенила, нитро (NO₂), тиола, тиоалкокси, тиоалкила, галогена, алкила, арила, алкенила и алкинила. Примеры 4'-заместителей, подходящих для небициклических модифицированных сахарных фрагментов, включают без ограничения алкокси (например, метокси) и алкил. Примеры групп 5-заместителей, подходящих для небициклических модифицированных сахарных фрагментов, включают без ограничения: 5-метил (R или S), 5-винил и 5-метокси. В определенных вариантах осуществления небициклические модифицированные сахарные фрагменты содержат более одного немостикового заместителя сахара, например, 2-F-5-метилсахарные фрагменты и т.п.

[70] В определенных вариантах осуществления 2'-замещенный небициклический модифицированный нуклеозид содержит сахарный фрагмент, содержащий немостиковую группу 2'-заместителя, выбранную из: F, NH₂, N₃, OCF₃, OCH₃, O(CH₂)₃NH₂, CH₂CH=CH₂, OCH₂CH=CH₂, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂ON(R_m)(R_n), O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂ и N-замещенного ацетамида (OCH₂C(=O)-N(R_m)(R_n)), где каждый R_m и R_n независимо представляет собой H, аминозащитную группу или замещенный или

незамещенный C₁₋₁₀ алкил.

[71] В определенных вариантах осуществления 2'-замещенный нуклеозид, небциклический модифицированный нуклеозид, содержит сахарный фрагмент, содержащий немостиковую группу 2'-заместителя, выбранную из: F, OCF₃, OCH₃, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂ и OCH₂C(=O)-N(H)CH₃ («NMA»).

[72] В определенных вариантах осуществления 2'-замещенный небциклический модифицированный нуклеозид содержит сахарный фрагмент, содержащий немостиковую группу 2'-заместителя, выбранную из: F, OCH₃ и OCH₂CH₂OCH₃.

[73] Определенные модифицированные сахарные фрагменты содержат заместитель, который связывает два атома фуранозильного кольца с образованием второго кольца, что приводит к образованию бициклического сахарного фрагмента. В определенных таких вариантах осуществления бициклический сахарный фрагмент содержит мостик между атомами фуранозного кольца в положении 4 и 2. Примеры таких 4-2 мостиковых заместителей сахара включают без ограничения: 4-CH₂-2, 4-(CH₂)₂-2, 4-(CH₂)₃-2, 4-CH₂-O-2 («LNA»), 4-CH₂-S-2, 4-(CH₂)₂-O-2 («ENA»), 4-CH(CH₃)-O-2 (обозначаемый как «ограниченный этил» или «сEt»), 4-CH₂-O-CH₂-2, 4-CH₂-N(R)-2, 4-CH(CH₂OCH₃)-O-2 («ограниченный МОЕ» или «сМОЕ») и их аналоги, 4-C(CH₃)(CH₃)-O-2 и их аналоги, 4-CH₂-N(OCH₃)-2 и их аналоги, 4-CH₂-O-N(CH₃)-2, 4-CH₂-C(H)(CH₃)-2, 4-CH₂-C(=CH₂)-2 и их аналоги, 4-C(R_aR_b)-N(R)-O-2, 4-C(R_aR_b)-O-N(R)-2, 4-CH₂-O-N(R)-2 и 4-CH₂-N(R)-O-2, где каждый R, R_a и R_b независимо представляет собой H, защитную группу или C₁₋₁₂ алкил.

[74] В определенных вариантах осуществления такие 4-2 мостика независимо содержат от 1 до 4 связанных групп, независимо выбранных из: -[C(R_a)(R_b)]_n-, -[C(R_a)(R_b)]_n-O-, -C(R_a)=C(R_b)-, -C(R_a)=N-, -C(=NR_a)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R_a)₂-, -S(=O)_x- и -N(R_a)-; где: x равно 0, 1 или 2; n равно 1, 2, 3 или 4; каждый R_a и R_b независимо представляет собой H, защитную группу, гидроксил, C₁₋₁₂ алкил, замещенный C₁₋₁₂ алкил, C₁₋₁₂ алкенил, замещенный C₂₋₁₂ алкенил, C₂₋₁₂ алкинил, замещенный C₂₋₁₂ алкинил, C₅₋₂₀ арил, замещенный C₅₋₂₀ арил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, гетероарил, замещенный гетероарил, C₅₋₇ алициклический радикал, замещенный C₅₋₇ алициклический радикал, галоген, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, COOJ₁, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, CN, сульфонил (S(=O)₂-J₁) или сульфоксил (S(=O)-J₁); и каждый J₁ и J₂ независимо представляет собой H, C₁₋₁₂ алкил, замещенный C₁₋₁₂ алкил, C₂₋₁₂ алкенил, замещенный C₂₋₁₂ алкенил, C₂₋₁₂ алкинил, замещенный C₂₋₁₂ алкинил, C₅₋₂₀ арил, замещенный C₅₋₂₀ арил, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, C₁₋₁₂ аминоалкил, замещенный C₁₋₁₂ аминоалкил или защитную группу.

[75] Дополнительные бициклические сахарные фрагменты известны уз уровня техники, см., например: Freier *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4429-4443, Alback *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 7731-7740, Singh *et al.*, *Chem. Commun.*, 1998, 4, 455-456;

Koshkin *et al.*, *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630; Kumar *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222; Singh *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039; Srivastava *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 20017, 129, 8362-8379; Wengel *et al.*, патент США № 7053207; Imanishi *et al.*, патент США № 6268490; Imanishi *et al.*, патент США № 6770748; Imanishi *et al.*, U.S. RE44779; Wengel *et al.*, патент США № 6794499; Wengel *et al.*, патент США № 6670461; Wengel *et al.*, патент США № 7034133; Wengel *et al.*, патент США № 8080644; Wengel *et al.*, патент США № 8034909; Wengel *et al.*, патент США № 8153365; Wengel *et al.*, патент США № 7572582; и Ramasamy *et al.*, патент США № 6525191; Torsten *et al.*, WO 2004/106356; Wengel *et al.*, WO 1999/014226; Seth *et al.*, WO 2007/134181; Seth *et al.*, патент США № 7547684; Seth *et al.*, патент США № 7666854; Seth *et al.*, патент США № 8088746; Seth *et al.*, патент США № 7750131; Seth *et al.*, патент США № 8030467; Seth *et al.*, патент США № 8268980; Seth *et al.*, патент США № 8546556; Seth *et al.*, патент США № 8530640; Migawa *et al.*, патент США № 9012421; Seth *et al.*, патент США № 8501805; и патентные публикации США №№ Allerson *et al.*, US2008/0039618 и Migawa *et al.*, US2015/0191727.

[76] Термины «субъект» и «пациент», используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к любому позвоночному, включая без ограничения млекопитающее (например, корову, свинью, верблюда, ламу, лошадь, козу, кролика, овцу, хомяков, морскую свинку, кошку, собаку, крысу и мышь, отличного от человека примата (например, обезьяну, такую как яванский или резус-макак, шимпанзе и т.д.) и человека). В некоторых вариантах осуществления субъект может представлять собой человека или отличный от человека организм. В предпочтительном варианте осуществления субъект или пациент является человеком. Субъект или пациент может проходить другие формы лечения. В одном варианте осуществления у пациента имеется неврологическое заболевание вследствие мутации гена C9ORF72 (например, у пациента может иметься гаплонедостаточность по гену C9ORF72 (например, такая, которая приводит к снижению активности белка C9ORF72 на 50% или больше), или ген C9ORF72 может содержать экспансию повтора GGGGCC (такую как экспансия гексануклеотида (GGGGCC)_n в C9ORF72)). Переменная «n» может быть равна по меньшей мере 30.

[77] Термин «терапевтически эффективное количество», или «эффективная доза», или «эффективное количество», используемый в данном документе взаимозаменяемо, если не указано иное, означает дозу лекарственного средства, эффективную в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого терапевтического результата. Эффективная дозировка может быть определена специалистом в данной области техники и может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и вес индивидуума, а также способность лекарственного средства вызывать требуемый ответ у индивидуума. Этот термин, используемый в данном документе, может также относиться к количеству, эффективному для достижения требуемого эффекта *in vivo* у животного, млекопитающего или человека, такого как снижение и/или ингибирование функции рецептора. Терапевтически эффективное количество может быть введено за одно или более введений (например, средство может

вводиться в качестве профилактического лечения или терапевтически на любой стадии прогрессирования заболевания, до или после появления симптомов и т.п.), применений или дозировок и не предназначено для ограничения конкретным составом, комбинацией или путем введения. В объем настоящего изобретения входит то, что лекарственное средство можно вводить в различные периоды времени в ходе лечения субъекта. Время введения и используемые дозы будут зависеть от нескольких факторов, таких как цель лечения (например, лечение или предупреждение), состояние субъекта и т.д. и могут быть легко определены специалистом в данной области техники.

[78] Используемый в данном документе термин «лечить» или «лечение» субъекта относится к введению композиции или средства, описанных в данном документе, субъекту, так что по меньшей мере один симптом заболевания или нарушения излечивается, облегчается, ослабляется, изменяется, исправляется, уменьшается, нормализуется или регрессирует. Лечение включает введение количества, эффективного для облегчения, ослабления, изменения, устранения, уменьшения, нормализации и/или регрессии одного или более симптомов, ассоциированных с заболеванием или нарушением. Лечение может ингибировать усугубление или ухудшение симптома, ассоциированного с заболеванием или нарушением.

[79] Описанные в данном документе способы лечения могут включать введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей эффективное количество одного или более антисмысловых олигонуклеотидов, которая лечит неврологические заболевания с помощью ингибирования или подавления экспрессии PIKFYVE. Один или более антисмысловых олигонуклеотидов могут уменьшать или ингибировать нейродегенерацию. Один или более антисмысловых олигонуклеотидов могут снижать гипервозбудимость нейронов. Снижение уровней mRNA PIKFYVE и белка PIKFYVE подавляет нейродегенерацию, вызванную токсичными агрегатами TDP-43, агрегатами DPR (например, у пациентов с C9ORF72-ALS), а также способствует сохранению TDP-43 в ядре. Доставка ASO, нацеленных на mRNA PIKFYVE, описанная в данном документе, снижает уровни белка PIKFYVE.

[80] Композиция может ингибировать активность киназы с помощью ингибирования экспрессии киназы. Композиция может ингибировать активность или экспрессию киназы PIKFYVE. Один или более антисмысловых олигонуклеотидов можно комбинировать с низкомолекулярными терапевтическими средствами (такими как апилимод и/или YM201636).

[81] В настоящем изобретении представлены олигонуклеотиды (модифицированные или немодифицированные), которые можно применять для модуляции экспрессии PIKFYVE. В таблице 1 представлена общая последовательность оснований (от 5' до 3') для антисмысловых олигонуклеотидов PIKFYVE или ингибирующих нуклеиновых кислот по настоящему изобретению:

Таблица 1

| SEQ ID NO. | Последовательность |
|------------|--------------------|
|------------|--------------------|

| | |
|----|-----------------------|
| 1 | ATGGCATGATCCCCATAAGC |
| 2 | AGGACCAGTACAACCTGTAG |
| 3 | AGGTGCCCAACTTGTTACC |
| 4 | ACTAAGGTGCCCAACTTGT |
| 5 | ACCAGGTAGTCCCAAATAAC |
| 6 | GCCTGACCCCTATACTTGAC |
| 7 | CTGACCCCTATACTTGACAG |
| 8 | TTAAGCCCTTTGGTCCAACC |
| 9 | GAGTTAGCACCCCTCTACTAC |
| 10 | GTCATAAGTCCTTGGTCAAC |
| 11 | AAGCCTGACCCCTATACTTG |
| 12 | AGCCTGACCCCTATACTTGA |
| 13 | CATCCTATTAGCTTAAACCC |
| 14 | CCTGACCCCTATACTTGACA |
| 15 | TATGATCTGATAGCCAATC |
| 16 | GTACCAGGACCAGTACAACC |
| 17 | CAGGACCAGTACAACCTGTA |
| 18 | ACACCCTTTGGAGTGTCTAG |
| 19 | GCCCCAACTTGTTACCTAAG |
| 20 | CCCCAATCTAGTTCAAGCAT |
| 21 | TCCAAGAGTTAGCACCCCTCT |
| 22 | GGACCAGTACAACCTGTAGT |
| 23 | AAACCCAGTGTAGCTCCATT |
| 24 | TGCCCAACTTGTTACCTAA |
| 25 | CCAATAGCAAGCAGCCTATA |
| 26 | CTACAATCAAATCCTGGTAG |
| 27 | GACCAAGTTTATGGACCCCA |
| 28 | GTGACCACCATCTATAGTTA |
| 29 | CTAAGGTAAGTGTTCCTAGA |
| 30 | TGACCAAGTTTATGGACCCC |
| 31 | ACCAAGTTTATGGACCCCAA |
| 32 | GCAATAAAGCTAACCACATC |
| 33 | GATTCTACCACACAGTACAC |
| 34 | GAGCCCTAACTGTATCTTCC |

| | |
|----|-----------------------|
| 35 | TAGCTGATTGCCCCCTTAACA |
| 36 | GAGACTGCTAAGGCTACTAC |
| 37 | GCTAAGCCCTAAGTATATCC |
| 38 | ACTACTGGTAAGGCAGTCCC |
| 39 | GGTATCCCTACACTTCTACA |
| 40 | GAGTACCAGGACCAGTACAA |
| 41 | ATAACCCCCCTGCTAAGAGC |
| 42 | CTTAGCTGATTGCCCCCTTAA |
| 43 | GCTATACTACTAGAAGAACC |
| 44 | GTACCTAAATACAGGTCCTA |
| 45 | AGGTATCCCTACACTTCTAC |
| 46 | GCCTACATCCAGTTGATTAG |
| 47 | GAGTGGTAATCAGTCCTATT |
| 48 | GACAAAGTCCTACCTGGTAC |
| 49 | GTAATCTGTTGAGATACACC |
| 50 | TCCTTAATACCCCAGGTTAT |
| 51 | TTCCATAACTAAGGTGCCCC |
| 52 | AACTAAGGTGCCCCAACCTTG |
| 53 | GTGCCCCAACCTTGTTACCTA |
| 54 | CAAGTCCCTATAACATAACC |
| 55 | GAGCAGTCAGATGTAGTTCC |
| 56 | AAGGATGGTGTAGGTTCCAA |
| 57 | TAACCCACTAGAATAGCACC |
| 58 | GGTATGCCCACCAAAGTTGT |
| 59 | GTACACCTTAGTCTAACAGT |
| 60 | ACCAAGGTACTCTGAACCTA |
| 61 | TGAGTGGTAATCAGTCCTAT |
| 62 | TACCCTTACCTAATCAAGAG |
| 63 | GTGAGCCCTAACTGTATCTT |
| 64 | AATAACCCCCCTGCTAAGAG |
| 65 | AACCAATAGTGACTTATGGC |
| 66 | TTAGCTGATTGCCCCCTAAC |
| 67 | AGCTGATTGCCCCCTAACAG |
| 68 | GCTAGTTTACATACCTGTCC |

| | |
|-----|-----------------------|
| 69 | CCTTAATACCCCAGGTTATC |
| 70 | TAACTAAGGTGCCCCAACCTT |
| 71 | TAAGGTGCCCCAACCTTGTTA |
| 72 | CCCAACTTGTTACCTAAGCA |
| 73 | GTTGGCACATCACACTATTA |
| 74 | ATGTTGAGGCTGTCACACTA |
| 75 | CTAACCTAAGGTAACCTGTTT |
| 76 | AGGACTAGAGACCCTTAAC |
| 77 | ACTTAACCTCCCCCTACATC |
| 78 | ATGGTGTAGGTTCCAAACCC |
| 79 | GGATCTACTCCTACTACTCC |
| 80 | TGACCCCTATACTTGACAGA |
| 81 | CCTTTGGTCCAACCTATAAT |
| 82 | GGTAAAACCTGACCTATGTC |
| 83 | AGCCAATAATGGAGTTGAC |
| 84 | GCCAATAATGGAGTTGACA |
| 85 | TTACTGGACAGATCCCTTAC |
| 86 | CTGAGTGGTAATCAGTCCTA |
| 87 | AGAGTTAGCACCCCTCTACTA |
| 88 | CCAATGCTGGTCAGTTGCTC |
| 89 | ACATAGTCCAATACCCTTAC |
| 90 | ACTGCCATTAGGACTGTTAC |
| 91 | GAAAGTAGTTGGACTCTCCC |
| 92 | TAGTTGGACTCTCCCAGTGC |
| 93 | GCTCCAAGTACTATGTCAAC |
| 94 | GGATAGAGGATTCAAGGCTC |
| 95 | TAACCCCCCTGCTAAGAGCC |
| 96 | ACTCAAGAACCAACCTGTAG |
| 97 | TGCTACAACCCAACCTCCCC |
| 98 | GATTGCCCTTAACAGAACC |
| 99 | GTTTAGACTTGCCACACTAA |
| 100 | TAAGCCCTGTCAGCACAAGG |
| 101 | GGTCTTGTAGACACCAATAA |
| 102 | CTTAATACCCCAGGTTATCT |

| | |
|-----|-----------------------|
| 103 | TTAATACCCCAGGTTATCTC |
| 104 | CATAACTAAGGTGCCCCAAC |
| 105 | AGTGGAGTACTATGGACTAA |
| 106 | GCCCATACTCAAGTTTATCC |
| 107 | CAATGTTGAGGCTGTCACAC |
| 108 | GGCATAGCTTATGGATCAAA |
| 109 | GGCTTTCACTCCACCAGATT |
| 110 | GACCCATCTCTCAGGTGATC |
| 111 | TAGCACAGGTATCCCTACAC |
| 112 | GCCTGTAGCCCTCCCCTAAA |
| 113 | TCCCAGTTGGTAATTCCACC |
| 114 | CCCAGTTGGTAATTCCACCC |
| 115 | TGGTAATTCCACCCCTCCAA |
| 116 | GGACTAGAGACCACTTAACC |
| 117 | GACCACTTAACCTCCCCCTA |
| 118 | GAGTACCCTCCAAGAATTT |
| 119 | ATGGAAGCCTGACCCCTATA |
| 120 | GCCCTGAACTAGATAAACAC |
| 121 | GCCCTTTGGTCCAACCTATA |
| 122 | CCCTTTGGTCCAACCTATAA |
| 123 | GACAGTAAAGGCTCCACCTG |
| 124 | TCAACAAGAAGCCTACTGAC |
| 125 | ATCATAAGAGCCCAATCAT |
| 126 | CATAAGAGCCCAATCATCT |
| 127 | TGATCTGATAGCCAACCTCAA |
| 128 | TCCTGAGTGGTAATCAGTCC |
| 129 | GACCTACTACAACTATCAG |
| 130 | AGACCAGGTTCAATAGAATC |
| 131 | AGTACCAGGACCAGTACAAC |
| 132 | AGTCCAATACCCTTACCTAA |
| 133 | GCATGTTAGATCCAAATCCC |
| 134 | GCCCAATAGCAAGCAGCCTA |
| 135 | GACTGACTAAAGGAGGAGCC |
| 136 | CAACCAGTATCAATACCCTC |

| | |
|-----|----------------------|
| 137 | TGGATAGAGGATTCAAGGCT |
| 138 | GTCCCAGCAAATCAACTACC |
| 139 | GTAGTTACCACCTAAACAGA |
| 140 | GATCACCAGACTCAAGAACC |
| 141 | GCAGCAACCTACCTGACATA |
| 142 | AGCAACCTACCTGACATACC |
| 143 | GCAACCTACCTGACATACCT |
| 144 | GACACCCTTTGGAGTGTCTA |
| 145 | CCTTAGCTGATTGCCCTTA |
| 146 | TACCATATAGGAAACCTCCT |
| 147 | CTATACTACTAGAAGAACCC |
| 148 | GTGCCCCCAAACAAGAAGTT |
| 149 | GTACACAAACATCCCTCTAA |
| 150 | CCATATTACACCTTAGGAAC |
| 151 | CCCCAACTTGTTACCTAAGC |
| 152 | CCAACCTGTTACCTAAGCAC |
| 153 | GCCTAACCAGTGGAGTACTA |
| 154 | ACCAGTGGAGTACTATGGAC |
| 155 | GTATACCATCCACCTGAGTT |
| 156 | GTGGCAAAGTTCACTACTC |
| 157 | GGTACTCTTCAGATACCTAA |
| 158 | GTACCTGAATCAAGACCCAC |
| 159 | TGGTAAGGCAGTCCCAACAA |
| 160 | ACAGGCATAGCTTATGGATC |
| 161 | AGGCATAGCTTATGGATCAA |
| 162 | TAGCACCTAAACCATCAAT |
| 163 | AGCAAGTAGTTACCCTTGAG |
| 164 | TCCACTATTAAGGATCTTCC |
| 165 | GCTGCCACCTAGAATTAGGT |
| 166 | TTAGCACAGGTATCCCTACA |
| 167 | TAGCCTGTAGCCCTCCCCTA |
| 168 | GTTGGTAATTCCACCCCTCC |
| 169 | CCTACATCCAGTTGATTAGC |
| 170 | GATTCACAGGACTAGAGACC |

| | |
|-----|-----------------------|
| 171 | AGGTGTCCAAACTACCATAA |
| 172 | GTGTCCAAACTACCATAAAC |
| 173 | CCTAACCAGTCAGCTATTAG |
| 174 | GATCCCTTTCCATGTACTAG |
| 175 | GCCTAGCATATATTACCCCA |
| 176 | GGAGACCACTATATTATCCC |
| 177 | GACAACCAGCAGAATCCCTA |
| 178 | GGTACTATATCCAACCTGGAC |
| 179 | CATTAGGTATGGCATGATCC |
| 180 | GAACATCACTTAAATGGTCC |
| 181 | AGCCCTTTGGTCCAACCTAT |
| 182 | GTATGCCACCAAAGTTGTC |
| 183 | ATACCAATGGCAAGGTTTGG |
| 184 | GCAAGTGGCAGCCCAATAAT |
| 185 | GCCAATAATCACACCCTTGG |
| 186 | ACAGATCCCTTACTACTATCA |
| 187 | ATCCCATACAGCCAGTTTGG |
| 188 | GCAACCAAGGTACTCTGAAC |
| 189 | TAAGTCCTTGGTCAACTTGC |
| 190 | GATGCCACCTAAATTGCTGG |
| 191 | GGATTCCCAGTTTAAGTCAA |
| 192 | GAAAGGTTATCTGTTGTGCC |
| 193 | GACTCCTTATAGTCACTACC |
| 194 | TACCAGGACCAGTACAACCT |
| 195 | GACCAGTACAACCTGTAGTA |
| 196 | GGTACAAAAGGTTCCAGTAG |
| 197 | GTACAAAAGGTTCCAGTAGC |
| 198 | GCTTCACATAGTCCAATACC |
| 199 | GTCCAATACCCTTACCTAAT |
| 200 | TACCTAATCAAGAGAAGGTC |
| 201 | TGAAAGTAGTTGGACTCTCC |
| 202 | AAAGTAGTTGGACTCTCCCA |
| 203 | ACCTAAGCCCACCTACAATA |
| 204 | ACTAAGTTCAGCTACCACCA |

| | |
|-----|----------------------|
| 205 | AACCCCCCTGCTAAGAGCCA |
| 206 | GCACTGTGGCTATTACACCC |
| 207 | ACCATGATGCTACCCTCAGT |
| 208 | GCCCCTTGAGTGCTGTTTAT |
| 209 | ACCAGGAGCATTGTTGATC |
| 210 | ATGCTACAACCCAACTCCCC |
| 211 | GCTGATTGCCCTTAACAGA |
| 212 | GACTGCTAAGGCTACTACAA |
| 213 | GTGAGGATCATGTAACAGTC |
| 214 | AGTTTAGACTTGCCACACTA |
| 215 | GTGTACCTAAATACAGGTCC |
| 216 | TGCCCACTGAAACCTTACTC |
| 217 | TATGCCCATCCCTAAGTTGT |
| 218 | GGACTATCTCTAATCAGTGG |
| 219 | AAGGTGCCCAACTTGTTAC |
| 220 | TCATTGCCTTACCTAAGTAC |
| 221 | CATTGCCTTACCTAAGTACA |
| 222 | CAGTGGAGTACTATGGACTA |
| 223 | GGAGTACTATGGACTAAGAA |
| 224 | TAAGCCCTAAGTATATCCTC |
| 225 | AAGTTCACTACTCCCAACTA |
| 226 | GGTTGGCACATCACACTATT |
| 227 | GTTTGCTTAACCAATGCTGG |
| 228 | ACAGTTTGCCTAAACCTGGC |
| 229 | ACACAATCCCATGATAGGAC |
| 230 | CCCCAATCTAGTTCAAGCA |
| 231 | GACTACCTCCTACTTTTAGT |
| 232 | AAGTACCTGAATCAAGACCC |
| 233 | CTACTGGTAAGGCAGTCCCA |
| 234 | GGTAAGGCAGTCCCAACAAA |
| 235 | TTAACAGCAAGTAGTTACCC |
| 236 | TCACACTAACCTAAGGTAAC |
| 237 | GATCTAAGAGTTAAGCTCTC |
| 238 | TAGAATACTTGACCCATCTC |

| | |
|-----|-----------------------|
| 239 | GCAACCCTATGTAAGTCTAT |
| 240 | GGCTGCCACCTAGAATTAGG |
| 241 | GTATCCCTACACTTCTACAC |
| 242 | AACTGTTCCCTCCAGTTGGT |
| 243 | CCAGTTGGTAATTCCACCCC |
| 244 | TTGGTAATTCCACCCCTCCA |
| 245 | GGTCAAAGACCTGAGTCACC |
| 246 | ACTCATGGAGTATTACTGCC |
| 247 | ATGGAGTATTACTGCCCCAA |
| 248 | AACCTCCCCCTACATCCTAT |
| 249 | CCCATCACATCAAGTTACAG |
| 250 | TATGACAATCAATCCCACCC |
| 251 | GAAATTCCCCTACCCAGTCC |
| 252 | AATTCCTTACCCAGTCCTA |
| 253 | CCCTAGACAGTGTAGTAGTT |
| 254 | TTCCAAGAGTTAGCACCCCTC |
| 255 | GTATATCCCAATGATACCAG |
| 256 | AACCAGTCAGCTATTAGAAC |
| 257 | GCCCTGCCATCAAAAACTC |
| 258 | TCAGGATCTACTCCTACTAC |
| 259 | CAGGATCTACTCCTACTACT |
| 260 | GAGCCACTTACAGATGATCC |
| 261 | GTTATTAGACACCTACTCTC |
| 262 | CTCTGTAGTAGTTTAGGTGG |
| 263 | GGAAGCCTGACCCCTATACT |
| 264 | GACCCCTATACTTGACAGAA |
| 265 | CTGCCCTGAACTAGATAAAC |
| 266 | GCTAAAACCTCCAATCCTATC |
| 267 | CCTATTAGCTTAAACCCATC |
| 268 | ACCATTTGCTAGATAGGTGC |
| 269 | GGCAGCCCAATAATGGAGTT |
| 270 | GCAGCCCAATAATGGAGTTG |
| 271 | ACAACCTATGATCTGATAGCC |
| 272 | GGAAGCTAGTTATACAACAC |

| | |
|-----|-----------------------|
| 273 | ATCAGTCCTATTAACCTACC |
| 274 | GGTAACTTAGCTTGGTCTC |
| 275 | GACAGGATTCCCAGTTTAAG |
| 276 | ACTTGAGTACCAGGACCAGT |
| 277 | CTTCACATAGTCCAATACCC |
| 278 | TTCACATAGTCCAATACCCT |
| 279 | CATAGTCCAATACCCTTACC |
| 280 | TAGTCCAATACCCTTACCTA |
| 281 | GGCTGCTCAATGACAAGTGG |
| 282 | GGACTAACCCAGAGGTCACC |
| 283 | GAGTCTGCCTATTCCTGATC |
| 284 | AGTAGTTGGACTCTCCCAGT |
| 285 | GTTCCCTACAGTTTAACACAG |
| 286 | GGTTCCCCACCAACAGAATG |
| 287 | TACCTAAGCCCACCTACAAT |
| 288 | ACCAGTATCAATACCCTCAA |
| 289 | GATGATCTCAGCTAGAATCC |
| 290 | GATCTCAGCTAGAATCCTTA |
| 291 | ATGGATAGAGGATTCAAGGC |
| 292 | AGCCCTAACTGTATCTTCCC |
| 293 | CTAAGAGTGATGACAGTTCC |
| 294 | GGACACTTAAACAGGCACTA |
| 295 | GAAAAATAACCCCCCTGCTA |
| 296 | AAAATAACCCCCCTGCTAAG |
| 297 | GACTGACTCCTATCCAACAC |
| 298 | CACCCTATTATACTCAGAGC |
| 299 | GTTTCTAGCCCCCTTGAGTGC |
| 300 | GTACCATATAGGAAACCTCC |
| 301 | ACCATATAGGAAACCTCCTC |
| 302 | CAAGTTTAGACTTGCCACAC |
| 303 | CCTGCTGAAGCTATACTACT |
| 304 | TACTAGAAGAACCCATGAGC |
| 305 | GATCCAGGATTATCATACCA |
| 306 | GCTTCACCCTTCTAGGACTA |

| | |
|-----|----------------------|
| 307 | GATTGCTCCTACCACTCTTG |
| 308 | GGTACTTCACAACTCCAA |
| 309 | GCTGACCAAGTTTATGGACC |
| 310 | GGTATTACACACTCAGCCTA |
| 311 | GTATTACACACTCAGCCTAG |
| 312 | GTCTCCTTAATACCCCAGGT |
| 313 | CTTCCATAACTAAGGTGCC |
| 314 | GGTGCCCCAACTTGTTACCT |
| 315 | CCCCTGTTCTCTAATGTACT |
| 316 | GCACTGCCAAGCTATCAGAT |
| 317 | TGCCAAGCTATCAGATAAGC |
| 318 | CCAGTGGAGTACTATGGACT |
| 319 | CTAATCAATGTGCTAAGCCC |
| 320 | GCACAGAATTAGCCCATACT |
| 321 | GAATTAGCCCATACTCAAGT |
| 322 | CTTAGAAGTCCCCAAGTCTA |
| 323 | CCTCAATAACCATGACAGGT |
| 324 | TCAGGTACTCTTCAGATACC |
| 325 | GCTCTTACATTCACCAGATA |
| 326 | TTGCTTAACCAATGCTGGTG |
| 327 | GCATACAGTTTGCCTAAACC |
| 328 | CACAATCCCATGATAGGACT |
| 329 | CAATCCCATGATAGGACTAT |
| 330 | TGTCAACCTAACAAGTTGGT |
| 331 | GTCAACCTAACAAGTTGGTT |
| 332 | TACTGGTAAGGCAGTCCCAA |
| 333 | CACCAGGTAGTCCCAAATAA |
| 334 | GGTAGTCCCAAATAACTTTC |
| 335 | ATTAGCACAGGTATCCCTAC |
| 336 | GTAGCCCTCCCCTAAATTCT |
| 337 | GGTAATTCCACCCCTCCAAC |
| 338 | GTCAAAGACCTGAGTCACCT |
| 339 | TGTGAGAGATCAACTCAACA |
| 340 | GGAGTATTACTGCCCAAAA |

| | |
|-----|-----------------------|
| 341 | CTAGAGACCACTTAACCTCC |
| 342 | GAGACCACTTAACCTCCCC |
| 343 | CCCCCTACATCCTATCACTA |
| 344 | CTATAGTGTATCCAGCCAAT |
| 345 | GGATGGTGTAGGTTCCAAAC |
| 346 | GATGGTGTAGGTTCCAAACC |
| 347 | TGTTACCACATTTCAGTCCC |
| 348 | AACTTCCAAGAGTTAGCACC |
| 349 | AGTACCCTCCAAAGAATTTC |
| 350 | GCCTAACCAGTCAGCTATTA |
| 351 | CCAGTCAGCTATTAGAACTA |
| 352 | GGTTTTGTCAAGCTAACAAC |
| 353 | GGCTGTAATGACCTCCCCTG |
| 354 | CTCAGGATCTACTCCTACTA |
| 355 | AGGATCTACTCCTACTACTC |
| 356 | GAAGCCTGACCCCTATACTT |
| 357 | GTAAAACCTGACCTATGTCC |
| 358 | GCTTAAACCCATCAAACCTGA |
| 359 | TCCAAATGGCTGATGTAACC |
| 360 | CAGCCCAATAATGGAGTTGA |
| 361 | GGTCTGTTTACTGGACAGAT |
| 362 | CAGATCCCTTACACTATCAA |
| 363 | ATCCAGACCTTTAGTTACCA |
| 364 | AATCATAAGAGCCCCAATCA |
| 365 | GATCTGATAGCCAACTCAAT |
| 366 | GGATGGCAAGATCCCATACA |
| 367 | GAACCCCAAGAGTGATGACC |
| 368 | CCTGAGTGGTAATCAGTCCT |
| 369 | TAACCTACCTACCCAAAGCC |
| 370 | GCACTAGATGGTTTGAATAC |
| 371 | GATCAGGCTCATTCACAACA |
| 372 | GCCACAAAGTTACCTACTAG |
| 373 | GGAACTTAGCATCACATTAG |
| 374 | GACAGCTCCACAGGTATCAA |

| | |
|-----|-----------------------|
| 375 | GCTATTATTAGACCAGGTTC |
| 376 | GACTTGAGTACCAGGACCAG |
| 377 | TTGAGTACCAGGACCAGTAC |
| 378 | CAGTTCAAGGACTAGCTCTT |
| 379 | CACATAGTCCAATACCCTTA |
| 380 | ATAGTCCAATACCCTTACCT |
| 381 | CTGCCATTAGGACTGTTACA |
| 382 | TGCCATTAGGACTGTTACAG |
| 383 | AAGGCTCACCTATAACAAC |
| 384 | GTATGACCATCCTTACATAC |
| 385 | AAGTAGTTGGACTCTCCCAG |
| 386 | AGTTGGACTCTCCCAGTGCC |
| 387 | GTACAGGTCACTACAGATGA |
| 388 | TAATATCCACTCCTACCTGG |
| 389 | CCTACCTAAGCCCACCTACA |
| 390 | GTGTAGCTCCATTTCAACTT |
| 391 | GGTGCTACTTACTGAACACC |
| 392 | CCCTAACTGTATCTTCCCAA |
| 393 | CACTGGCTAGTGCTTTATCC |
| 394 | GCAACTGTCAACCAAGACTG |
| 395 | GTAATCCAGGTCATAGTTCC |
| 396 | CCAATAGTGACTTATGGCAT |
| 397 | CCAGGCAGCAACCTACCTGA |
| 398 | GGAGACTGCTAAGGCTACTA |
| 399 | AGACTGCTAAGGCTACTACA |
| 400 | GCATTACCAATAAATCCACC |
| 401 | TGGTCAGTCTACCCAGTTAA |
| 402 | GCCCTTCTCACATTAAGCAT |
| 403 | AATTACCATGCCCCAGAGAC |
| 404 | CCTAAATACAGGTCCTAATG |
| 405 | AACATCAATCTGAGACACCC |
| 406 | GTTGCCTATCCTCACTTACC |
| 407 | CCTCAGGTC AATCTATGCTA |
| 408 | TATGCCCACTGAAACCTTAC |

| | |
|-----|----------------------|
| 409 | AGGTTACTTCACAACTCCA |
| 410 | GCCCATATTACACCTTAGGA |
| 411 | ATAACTAAGGTGCCCAACT |
| 412 | ATCTTCCACTAAGAAGTCCC |
| 413 | TGCTAAGCCCTAAGTATATC |
| 414 | AAGCCCTAAGTATATCCTCA |
| 415 | GTATCTATATGAGACTCCAG |
| 416 | TATACCATCCACCTGAGTTC |
| 417 | GCAAAAGTTCACTACTCCCA |
| 418 | GTTCACTACTCCCAACTACT |
| 419 | AGGTACTCTTCAGATACCTA |
| 420 | GTCCCTATAACATAACCTAG |
| 421 | CAAGTGACCACCATCTATAG |
| 422 | GCTAGTCAAGTCTCATTAAC |
| 423 | TTACACAATCCCATGATAGG |
| 424 | ACAATCCCATGATAGGACTA |
| 425 | CCCAATCTAGTTCAAGCATC |
| 426 | AGATGGTGACTACCTCCTAC |
| 427 | CTGGTAAGGCAGTCCCAACA |
| 428 | TAAGGCAGTCCCAACAAAAC |
| 429 | AAGCAGGACCTGTCTGTTAC |
| 430 | GACAGGCATAGCTTATGGAT |
| 431 | CTAGATTAGTGAACAGTAGC |
| 432 | CACACTAACCTAAGGTAACT |
| 433 | CCAGGTAGTCCCAAATAACT |
| 434 | GTAGTCCCAAATAACTTTCC |
| 435 | ATTGCCCCCAGACTCCTACT |
| 436 | CCCAGACTCCTACTTAAAC |
| 437 | GAGTATAGAATACTTGACCC |
| 438 | GTAAATTAGCACAGGTATCC |
| 439 | ACTGTTCCCTCCAGTTGGTA |
| 440 | GTTCCCTCCAGTTGGTAATT |
| 441 | CTCCCAGTTGGTAATTCCAC |
| 442 | CAGTTGGTAATTCCACCCCT |

| | |
|-----|-----------------------|
| 443 | AGTTGGTAATTCCACCCCTC |
| 444 | GTACCCTGATGATACCCTTC |
| 445 | GGTTAGAATGGATCAAACC |
| 446 | GTCAAAGTAGGTCCACTGAA |
| 447 | ACTTCCAAGAGTTAGCACCC |
| 448 | ACCCTCTACTACCAAGCAGT |
| 449 | GGTGTCCAAACTACCATAAA |
| 450 | CTAACCAGTCAGCTATTAGA |
| 451 | ATCAGCAAGAGCCTATTAAG |
| 452 | GCAGGTTTCAGTGCTAAGATT |
| 453 | GTAAGACTTGCTGACTCACC |
| 454 | CAAGTAGCTGTAAGTCCAAC |
| 455 | ATCCCCAAAGAGACCTATGC |
| 456 | CAACCAGCAGAATCCCTATA |
| 457 | TTAGGTATGGCATGATCCCC |
| 458 | TAAGCCCTTTGGTCCAACCT |
| 459 | AAGCCCTTTGGTCCAACCTA |
| 460 | TACCAATGGCAAGGTTTGGC |
| 461 | TTGTTCTGGCTGACCAAGTC |
| 462 | GTTCTGGCTGACCAAGTCTG |
| 463 | TCACCTTGACTTAGGCAAAC |
| 464 | GGCAAACCACTCCAAGTTGA |
| 465 | CAAGTGGCAGCCCAATAATG |
| 466 | TTTACTGGACAGATCCCTTA |
| 467 | TACTGGACAGATCCCTTACA |
| 468 | GGACAGATCCCTTACACTAT |
| 469 | CTGAACAGAGTACTAACCAC |
| 470 | ATAAGAGCCCCAATCATCTA |
| 471 | CCTAAACACATGAACCTGGT |
| 472 | TAATGTAGACTGGTCCAGGC |
| 473 | AAGGAGCCCCCAGTTGATCT |
| 474 | GATCCCATACAGCCAGTTTG |
| 475 | TTGAGGCAACCAAGGTACTC |
| 476 | CAACCAAGGTACTCTGAACC |

| | |
|-----|-------------------------|
| 477 | CCAAGGTACTCTGAACCTAA |
| 478 | AGTAGAACTGTCACTATAACC |
| 479 | GTAACAACCACCCCTGGAAA |
| 480 | TTCTGAGTGGTAATCAGTC |
| 481 | GACTACCTCTATTGTCAACA |
| 482 | ACACCTTGTACTIONTCAAGTGC |
| 483 | CTTAGTAGTCAGAACTAGCC |
| 484 | GGACAGTCTAAACAGCCACA |
| 485 | GGAAAGGTTATCTGTTGTGC |
| 486 | AAGGTTATCTGTTGTGCCAC |
| 487 | GGACAAAGTCCTACCTGGTA |
| 488 | TGAGTACCAGGACCAGTACA |
| 489 | ACCCTTACCTAATCAAGAGA |
| 490 | TAAAGGAAGCATCCCCTTGT |
| 491 | AACTGCCATTAGGACTGTTA |
| 492 | TGAGAAAGGCTCACCTATAA |
| 493 | ATCTATGCCTTCCAAGGATC |
| 494 | GCTACAGCCCAATAGCAAGC |
| 495 | GGTCATCAGAGTCTGCCTAT |
| 496 | CCTGATCTAAACCCATACCC |
| 497 | GTAGTTGGACTCTCCCAGTG |
| 498 | ACAGACACTAGTATTGCCTC |
| 499 | AATATCCACTCCTACCTGGT |
| 500 | TGGTCCCCACCAACAGAAT |

[82] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлены модифицированные олигонуклеотиды, состоящие из 12-30 связанных нуклеозидов и имеющие последовательность нуклеиновых оснований, содержащую по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19 или по меньшей мере 20 последовательных нуклеотидных оснований любой из последовательностей нуклеиновых оснований SEQ ID NO:1-500 в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид является на по меньшей мере от 80% до 100% (т.е. 80%, 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98% или 100%; или любой числовой диапазон или значение между любыми из вышеуказанных значений), идентичным любой из последовательностей, содержащих или состоящих из SEQ ID NO: 1-500.

[83] Последовательности, представленные в таблице 1, можно применять для разработки антисмысловых молекул для ингибирования экспрессии PIKFYVE. Например, олигонуклеотиды гэпмеров могут быть разработаны с использованием последовательностей, представленных в таблице 1, и могут содержать 5'-крыло из около 3-5 нуклеотидов, 3'-крыло из около 3-5 нуклеотидов и область гэпа, содержащую 8-12 последовательных дезоксирибонуклеозидов любой из последовательностей таблицы 1. В одном варианте осуществления олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит гэпмер, имеющий гэп-сегмент из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19 или по меньшей мере 20 последовательных нуклеотидных оснований любой из последовательностей нуклеиновых оснований SEQ ID NO:1-136 в таблице 1; фланкирован 5'- и 3'-сегментами крыла, где гэп-сегмент расположен между 5'- и 3'-сегментами крыла и где каждый из сегментов крыла содержит модифицированный сахар. В одном варианте осуществления гэп-сегмент имеет длину 8-10 нуклеозидов, а каждый сегмент крыла имеет длину 3-5 модифицированных нуклеозидов. В еще одном варианте осуществления олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит 5'-сегмент крыла, содержащий модифицированные сахара и имеющий последовательность нуклеиновых оснований первых 3-5 нуклеиновых оснований любой из SEQ ID NO: 1-500, за которой следует гэп следующих 8-12 немодифицированных нуклеотидов одной и той же последовательности, соответствующей SEQ ID NO: 1-500, за которыми следует 3'-сегмент крыла, содержащий модифицированные сахара и имеющий последовательность нуклеиновых оснований последних 3-5 нуклеиновых оснований той же последовательности, соответствующей SEQ ID NO: 1-500. В таблице 2 представлены гэпмеры МОЕ по настоящему изобретению.

[84] 5'- и/или 3'-крылья могут содержать следующие химические соединения: 2'-ОМе, 2'-МОЕ, LNA или ДНК, используемые сами по себе или используемые в комбинации друг с другом. Связь основы 5'- и/или 3'-крыльев может представлять собой фосфоротиоат или смесь фосфодиэфира и фосфоротиоата. Связи в области гэпа могут быть фосфоротиоатными.

[85] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является одноцепочечным. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит фрагмент или образует комплекс с фрагментом, который нейтрализует заряд олигонуклеотида, способствуя захвату и переносу через клеточную мембрану.

[86] В одном варианте осуществления каждый из ASO в таблице 1 имеет следующий мотив 5-10-5: 2МОЕ*2МОЕ-2МОЕ-2МОЕ-2МОЕ-N*N*N*N*N*N*N*N*N*N*2МОЕ-2МОЕ-2МОЕ*2МОЕ*2МОЕ, где (i) 2МОЕ представляет собой нуклеиновое основание с 2'-OCH₂CH₂-OCH₃ группой (т.е. 2'-МОЕ), (ii) N представляет собой нуклеиновое основание, (iii) звездочка (*) относится к тиофосфатной связи, а (iv) тире (-) относится к фосфодиэфирной связи. В таблице 2 ниже

показан этот мотив в SEQ ID NO: 1-33 (в данном документе SEQ ID NO: 501-533).

[87] Таблица 2. Последовательность оснований в антисмысловых олигонуклеотидах (ASO), нацеленных на PIKFYVE. (Дизайн гэпмера: 5'- пять нуклеотидов 2'-метоксиэтилрибозы - десять нуклеотидов ДНК - пять нуклеотидов 2'-метоксиэтилрибозы - 3'; заглавные буквы представляют собой нуклеозиды 2'-метоксиэтилрибозы; строчные буквы представляют собой нуклеозиды ДНК; звездочки (*) представляют собой фосфоротионатные связи; связи, которые не отмечены звездочкой, представляют собой фосфодиэфирные связи) (обратите внимание, что в следующей таблице представлены крылья 2'МОЕ; однако предусмотрены альтернативные крылья, содержащие 2'-ОМе или LNA (закрытая нуклеиновая кислота)).

Таблица 2

| SEQ ID NO. | Последовательность |
|------------|-----------------------------------|
| 501 | A*TGGCa*t*g*a*t*c*c*c*a*ТАА*G*C |
| 502 | A*GGACc*a*g*t*a*c*a*a*c*c*TGT*A*G |
| 503 | A*GGTGc*c*c*c*a*a*c*t*t*g*TTA*C*C |
| 504 | A*CTAAg*g*t*g*c*c*c*c*a*a*CTT*G*T |
| 505 | A*CCAGg*t*a*g*t*c*c*c*a*a*ATA*A*C |
| 506 | G*CCTGa*c*c*c*c*t*a*t*a*c*TTG*A*C |
| 507 | C*TGACc*c*c*t*a*t*a*c*t*t*GAC*A*G |
| 508 | T*TAAGc*c*c*t*t*t*g*g*t*c*CAA*C*C |
| 509 | G*AGTTa*g*c*a*c*c*c*t*c*t*ACT*A*C |
| 510 | G*TCATa*a*g*t*c*c*t*t*g*g*TCA*A*C |
| 511 | A*AGCCt*g*a*c*c*c*c*t*a*t*ACT*T*G |
| 512 | A*GCCTg*a*c*c*c*c*t*a*t*a*CTT*G*A |
| 513 | C*ATCCt*a*t*t*a*g*c*t*t*a*AAC*C*C |
| 514 | C*CTGAc*c*c*c*t*a*t*a*c*t*TGA*C*A |
| 515 | T*ATGAt*c*t*g*a*t*a*g*c*c*AAC*T*C |
| 516 | G*TACCa*g*g*a*c*c*a*g*t*a*CAA*C*C |
| 517 | C*AGGAc*c*a*g*t*a*c*a*a*c*CTG*T*A |
| 518 | A*CACCc*t*t*t*g*g*a*g*t*g*TCT*A*G |
| 519 | G*CCCCa*a*c*t*t*g*t*t*a*c*CTA*A*G |
| 520 | C*CCCAa*t*c*t*a*g*t*t*c*a*AGC*A*T |
| 521 | T*CCAAG*a*g*t*t*a*g*c*a*c*CCT*C*T |
| 522 | G*GACCa*g*t*a*c*a*a*c*c*t*GTA*G*T |
| 523 | A*AACCc*a*g*t*g*t*a*g*c*t*CCA*T*T |
| 524 | T*GCCCc*a*a*c*t*t*g*t*t*a*CCT*A*A |

| | |
|-----|-----------------------------------|
| 525 | C*CAATa*g*c*a*a*g*c*a*g*c*CTA*T*A |
| 526 | C*ТАСАa*t*c*a*a*a*t*c*c*t*GGT*A*G |
| 527 | G*ACCAa*g*t*t*t*a*t*g*g*a*CCC*C*A |
| 528 | G*TGACc*a*c*c*a*t*c*t*a*t*AGT*T*A |
| 529 | C*ТАAGg*t*a*a*c*t*g*t*t*c*CTA*G*A |
| 530 | T*GACCa*a*g*t*t*t*a*t*g*g*ACC*C*C |
| 531 | A*CCAAG*t*t*t*a*t*g*g*a*c*CCC*A*A |
| 532 | G*CAATa*a*a*g*c*t*a*a*c*c*ACA*T*C |
| 533 | G*ATTct*a*c*c*a*c*a*c*a*g*TAC*A*C |

[88] Антисмысловые или ингибирующие нуклеиновые кислоты киназы PIKFYVE по настоящему изобретению могут ингибировать экспрессию и, следовательно, активность, ассоциированную с PIKFYVE. Антисмысловые или ингибирующие киназу PIKFYVE нуклеиновые кислоты могут включать любую комбинацию олигонуклеотидов, представленных в таблице 2, и последовательностей, которые на 98%-99% идентичны им.

[89] ASO, нацеленные на PIKFYVE, описанные в данном документе, такие как SEQ ID NO: 501-533, подавляют экспрессию mRNA PIKFYVE с минимальным нецелевым связыванием.

[90] Способы лечения могут включать любое количество способов введения раскрытой композиции. Способы введения могут включать водные, липидные, масляные или другие растворы, растворы в искусственной спинномозговой жидкости, эмульсии, такие как эмульсии масло в воде, липосомы, водные или масляные суспензии и т.п. Обычно ASO по настоящему изобретению вводят непосредственно в ЦНС субъекта. Соответственно, состав или композиция будут стерильными и более предпочтительно подходящими для инъекций. Следующие составы и способы являются просто только иллюстративными и никоим образом не несут ограничивающий характер.

[91] Составы, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные изотонические стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические вещества и растворенные вещества, которые делают состав изотоничным по отношению к крови предполагаемого реципиента, а также водные и неводные стерильные суспензии, которые могут содержать суспендирующие средства, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. Составы могут быть представлены в запечатанных контейнерах для стандартной дозы или многократной дозы, таких как ампулы и флаконы, и могут храниться в виде жидкостей или в высушенном сублимацией (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого вспомогательного вещества, например, воды для инъекций, непосредственно перед применением. Экстемпоральные инъекционные растворы и суспензии могут быть получены из стерильных порошков, гранул и таблеток. Состав может быть представлен в предварительно заполненном шприце.

[92] Дополнительное(ые) терапевтическое(ие) средство(а) можно вводить одновременно или последовательно с раскрытыми одной или более антисмысловыми или ингибирующими нуклеиновыми кислотами и композициями. Последовательное введение включает введение до или после раскрытых одной или более антисмысловых или ингибирующих нуклеиновых кислот или композиций. В некоторых вариантах осуществления дополнительное(ые) терапевтическое(ие) средство или средства можно вводить в той же композиции, что и раскрытая одна или более антисмысловых или ингибирующих нуклеиновых кислот. В других вариантах осуществления может существовать интервал времени между введением дополнительного терапевтического средства и раскрытой одной или более антисмысловых или ингибирующих нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления введение дополнительного терапевтического средства с раскрытой одной или более антисмысловыми или ингибирующими нуклеиновыми кислотами может обеспечить более низкие дозы других терапевтических средств и/или введение с менее частыми интервалами. При применении в комбинации с одним или более другими активными ингредиентами одну или более антисмысловых или ингибирующих нуклеиновых кислот по настоящему изобретению и другие активные ингредиенты можно использовать в более низких дозах, чем при использовании каждой из них по отдельности. Соответственно, фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают те, которые содержат один или более других активных ингредиентов в дополнение к одной или более антисмысловым или ингибирующим нуклеиновым кислотам по настоящему изобретению. Вышеупомянутые комбинации включают комбинации одной или более антисмысловых или ингибирующих нуклеиновых кислот по настоящему изобретению не только с одним другим активным соединением, но также с двумя или более другими активными соединениями. Например, соединение по настоящему изобретению можно комбинировать с различными лекарственными средствами для лечения неврологических заболеваний. Антисмысловой олигонуклеотид может быть ковалентно связан с другим олигонуклеотидом, например, с мишенью, отличной от PIKFYVE. Антисмысловой олигонуклеотид может быть ковалентно связан с антителом.

[93] Раскрытые одну или более антисмысловых или ингибирующих нуклеиновых кислот можно комбинировать со следующими без ограничения антихолинергическими лекарственными средствами, противосудорожными средствами, антидепрессантами, бензодиазепинами, противоотечными средствами, миорелаксантами, обезболивающими препаратами и/или стимуляторами. Дополнительные типы терапии и лечения включают без ограничения устройства цифровой связи, зонды для кормления, искусственную вентиляцию легких, пищевую поддержку, глубокую стимуляцию мозга, трудотерапию, физиотерапию и/или логопедию.

[94] Раскрытая(ые) композиция(ии) может(гут) быть включена(ы) в фармацевтическую композицию, подходящую для введения субъекту (например, пациенту, который может быть человеком или отличным от человека организмом).

Фармацевтические композиции могут содержать носитель (например, фармацевтически приемлемый носитель). В контексте настоящего изобретения можно использовать любой подходящий носитель, и такие носители хорошо известны в данной области техники. Выбор носителя будет частично определяться конкретным применением композиции (например, введением животному) и конкретным методом, используемым для введения композиции. Соответственно, существует широкий выбор подходящих составов композиции по настоящему изобретению.

[95] Фармацевтические композиции могут содержать терапевтически эффективное количество или профилактически эффективное количество антисмыслового олигонуклеотида. Терапевтически эффективное количество композиции может определить специалист в данной области техники и оно может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и вес индивидуума, а также способность композиции вызывать требуемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой такое количество, в котором любые токсические или вредные эффекты одной или более антисмысловых или ингибирующих нуклеиновых кислот по настоящему изобретению перевешиваются терапевтически полезными эффектами. «Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого профилактического результата. Обычно, поскольку профилактическая доза применяется у субъектов до или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше, чем терапевтически эффективное количество.

[96] Фармацевтические композиции могут содержать один или более фармацевтически приемлемых носителей. Термин «фармацевтически приемлемый носитель», используемый в данном документе, означает нетоксичный, инертный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или вспомогательное средство для приготовления любого типа. Некоторыми примерами материалов, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, являются сахара, такие как без ограничения лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как без ограничения кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлоза и ее производные, такие как без ограничения натрийкарбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; наполнители, такие как без ограничения масло какао и воски для суппозитория; масла, такие как без ограничения арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли; такие как пропиленгликоль; сложные эфиры, такие как без ограничения этилолеат и этиллаурат; агар; буферные средства, такие как без ограничения гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновая кислота; апирогенная вода; изотонический физиологический раствор; раствор Рингера; этиловый спирт и фосфатные буферные растворы, а также другие нетоксичные совместимые смазочные материалы, такие как без ограничения лаурилсульфат натрия и

стеарат магния, а также антиадгезивы, покрывающие средства, консерванты и антиоксиданты, с точки зрения составителя.

[97] Путь введения раскрытых одной или более антисмысловых или ингибирующих нуклеиновых кислот и форма композиции будут определять тип используемого носителя.

[98] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить несколькими способами в зависимости от того, требуется ли местное или системное лечение, а также от области, подлежащей лечению. Введение может быть парентеральным, включая внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию; или интракраниальное, например, интратекальное, интрацеребровентрикулярное или внутрижелудочковое введение. В одном варианте осуществления антисмысловую или ингибирующую нуклеиновую кислоту вводят внутривенно, внутрибрюшинно или в виде болюсной инъекции или вводят непосредственно в орган-мишень. В другом варианте осуществления антисмысловую или ингибирующую нуклеиновую кислоту вводят интратекально или интрацеребровентрикулярно в виде болюсной инъекции.

[99] Носители для системного введения обычно включают по меньшей мере один из растворителей, разбавителей, смазок, связующих, разрыхлителей, красителей, ароматизаторов, подсластителей, антиоксидантов, консервантов, скользящих веществ, растворителей, суспендирующих средств, смачивающих средств, поверхностно-активных веществ, их комбинаций и других. Все носители не являются обязательными в композициях.

[100] Подходящие разбавители включают сахара, такие как глюкоза, лактоза, декстроза и сахароза; диолы, такие как пропиленгликоль; карбонат кальция; карбонат натрия; сахарные спирты, такие как глицерин; маннит; и сорбит.

[101] Подходящие смазочные материалы включают диоксид кремния, тальк, стеариновую кислоту и ее соли магния и соли кальция, сульфат кальция; и жидкие смазочные материалы, такие как полиэтиленгликоль, и растительные масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и масло какао-бобов. Количество смазывающего(их) средства(средств) в композиции для системного или местного применения обычно составляет от около 5 до около 10%.

[102] Подходящие связующие включают поливинилпирролидон; алюмосиликат магния; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; желатин; трагакант; и целлюлоза и ее производные, такие как натрийкарбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза, метилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза и натрийкарбоксиметилцеллюлоза. Количество связующего(их) в композиции для системного применения обычно составляет от около 5 до около 50%.

[103] Подходящие разрыхлители включают агар, альгиновую кислоту и ее натриевую соль, шипучие смеси, кроскармелозу, кросповидон, натрийкарбоксиметилкрахмал, натрий-гликолят крахмала, глины и ионообменные смолы.

Количество дезинтегранта(ов) в композиции для системного применения обычно составляет от около 0,1 до около 10%.

[104] Подходящие красители включают краситель, такой как краситель FD&C. При использовании количество красителя в композиции для системного или местного применения обычно составляет от около 0,005 до около 0,1%.

[105] Подходящие ароматизаторы включают ментоловые, мятные и фруктовые ароматизаторы. Количество ароматизатора(ов) при использовании в композиции для системного или местного применения обычно составляет от около 0,1 до около 1,0%.

[106] Подходящие антиоксиданты включают бутилированный гидроксианизол («ВНА»), бутилированный гидрокситолуол («ВНТ») и витамин Е. Количество антиоксиданта(ов) в композиции для системного или местного применения обычно составляет от около 0,1 до около 5%.

[107] Подходящие консерванты включают хлорид бензалкония, метилпарабен и бензоат натрия. Количество консерванта(ов) в композиции для системного или местного применения обычно составляет от около 0,01 до около 5%.

[108] Подходящие скользящие вещества включают диоксид кремния. Количество скользящего(их) вещества(веществ) в композиции для системного или местного применения обычно составляет от около 1 до около 5%.

[109] Подходящие растворители включают воду, изотонический солевой раствор, этилолеат, глицерин, гидроксильированные касторовые масла, спирты, такие как этанол, и фосфатные буферные растворы. Количество растворителя(ей) в композиции для системного или местного применения обычно составляет от около 0 до около 100%.

[110] Подходящие суспендирующие средства включают AVICEL RC-591 (от FMC Corporation из Филадельфии, Пенсильвания) и альгинат натрия. Количество суспендирующего(их) средства(средств) в композиции для системного или местного применения обычно составляет от около 1 до около 8%.

[111] Подходящие поверхностно-активные вещества включают лецитин, полисорбат 80 и лаурилсульфат натрия, а также TWEENS от Atlas Powder Company из Уилмингтона, штат Делавэр. Подходящие поверхностно-активные вещества включают поверхностно-активные вещества, раскрытые в C.T.F.A. Cosmetic Ingredient Handbook, 1992, pp.587-592; Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed. 1975, pp. 335-337; и McCutcheon's Volume 1, Emulsifiers & Detergents, 1994, North American Edition, pp. 236-239. Количество поверхностно-активного(ых) вещества(веществ) в композиции для системного или местного применения обычно составляет от около 0,1% до около 5%.

[112] Композиции и составы для парентерального, интратекального, интрацеребровентрикулярного или внутрижелудочкового введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки, такие как без ограничения усилители проникновения, соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или вспомогательные вещества. Например, для доставки антисмысловых составов по

настоящему изобретению можно использовать интратекальный катетер спинномозговой жидкости (CSF). Катетер можно вводить в позвонок L3 или L4. Дистальный конец катетера проходит в интратекальном пространстве до примерно позвонка L1. Антисмысловые олигонуклеотиды растворяют в солевом растворе, стерилизуют фильтрованием и вводят со скоростью 0,33 мл/мин в объеме 1,0 мл с последующим промыванием стерильной водой объемом 0,5 мл. Общее время инфузии составляет 4,5 мин.

[113] Композиции для парентерального введения обычно включают от 0,1% до 10% активных веществ и от 90% до 99,9% носителя, включая разбавитель и растворитель.

[114] Количество носителя, используемого в сочетании с раскрытым соединением, достаточно для обеспечения практического количества композиции для введения на стандартную дозу лекарственного средства. Методики и композиции для изготовления лекарственных форм, пригодных в способах по настоящему изобретению, описаны в следующих ссылках: Modern Pharmaceutics, Chapters 9 and 10, Banker & Rhodes, eds. (1979); Lieberman et al., Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets (1981); и Ansel, Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 2nd Ed., (1976).

[115] Тестирование *in vivo* потенциальных антисмысловых или ингибирующих нуклеиновых кислот можно проводить способами, известными специалистам в данной области техники. Например, одну или более антисмысловых или ингибирующих нуклеиновых кислот-кандидатов можно вводить млекопитающему, такому как мышь или кролик. Млекопитающему можно вводить любым путем, который считается подходящим, дозу антисмысловой или ингибирующей нуклеиновой кислоты-кандидата. Затем можно использовать обычные методы и критерии для мониторинга животных в отношении признаков ослабления или улучшения активности двигательных нейронов и/или экспрессии или активности гена или белка PIKFYVE соответственно. При необходимости результаты, полученные в присутствии антисмысловых или ингибирующих нуклеиновых кислот-кандидатов, можно сравнить с результатами у контрольных животных, которых не обрабатывали антисмысловыми или ингибирующими нуклеиновыми кислотами-кандидатами. Исследования по введению дозы можно проводить с помощью описанных в данном документе способов или в сочетании с ними для идентификации одной или более антисмысловых или ингибирующих нуклеиновых кислот, способных лечить неврологическое заболевание, и/или любого последующего тестирования антисмысловых или ингибирующих нуклеиновых кислот-кандидатов *in vivo*. Специалист в области медицины может определить подходящую дозу одной или более антисмысловых или ингибирующих нуклеиновых кислот. Доза может быть определена с помощью наблюдения субъекта в отношении признаков ингибирования или нормализации заболевания. Доза может быть увеличена или уменьшена для достижения требуемой частоты обработки. Токсичность и эффективность одной или более антисмысловых или ингибирующих нуклеиновых кислот можно определить с помощью стандартных фармацевтических процедур на клеточных культурах или экспериментальных животных,

например, определение летальной дозы для 50% популяции (LD50) и дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции (ED50). Соотношение доз LD50/ED50 является терапевтическим индексом и указывает на соотношение токсического и терапевтического эффектов. Система доставки может быть разработана так, чтобы способствовать предупреждению токсических побочных эффектов с помощью доставки одной или более антисмысловых или ингибирующих нуклеиновых кислот к конкретным мишеням, например, с помощью доставки специфично к двигательным нейронам или нейронам центральной нервной системы. Оптимальная доза одной или более антисмысловых или ингибирующих нуклеиновых кислот может быть определена на основании результатов клинической электрофизиологии или электромиографии, например, для анализа возбудимости периферических нервов.

[116] Доза для применения у людей может быть определена с помощью оценки данных, полученных в ходе исследований на животных и анализов на клеточных культурах. Предпочтительная доза будет иметь небольшую токсичность или не иметь ее вообще и включать ED50. Доза может варьироваться в зависимости от лекарственной формы и пути введения. Для любой антисмысловой или ингибирующей нуклеиновой кислоты, используемой в способах, описанных в данном документе, доза может быть первоначально оценена в культуре клеток. Доза может быть составлена на животных моделях, которая включает концентрацию тестируемого соединения, которая обеспечивает половину максимального ингибирования симптомов (LD50), как определено в клеточной культуре. Такая информация, полученная на основании клеточных культур и моделей животных, может быть использована для более точного определения пригодных доз для людей.

[117] Настоящее изобретение имеет множество аспектов, проиллюстрированных следующими неограничивающими примерами.

[118] Примеры

[119] Маломолекулярные ингибиторы киназы PIKFYVE и антисмысловые олигонуклеотиды (ASO), которые подавляют экспрессию PIKFYVE, могут предупреждать дегенерацию нейронов человека и мыши, несущих мутацию в гене *C9ORF72*, которая приводит к боковому амиотрофическому склерозу (ALS) и лобно-височной деменции (FTD).

[120] ASO являются перспективным вариантом терапии нейродегенеративных заболеваний вследствие легкости их доставки в центральную нервную систему и относительно низкого воздействия на периферию. Эти свойства максимизируют целевое поражение в центральной нервной системе и минимизируют нежелательное целевое поражение или нецелевые эффекты на периферии.

[121] В настоящем изобретении представлены новые последовательности антисмысловых олигонуклеотидов (ASO), нацеленные на ген PIKFYVE, которые могут подавлять экспрессию PIKFYVE в клетках человека. ASO, нацеленные на PIKFYVE, также могут сохранить выживаемость двигательных нейронов, полученных от пациентов

со спорадическим ALS. Более того, ASO, нацеленные на PIKFYVE, могут снижать уровни нейротоксических агрегатов белковых дипептидных повторов, полученных в результате экспансии повторов *C9ORF72* *in vivo* у мышей.

Пример 1

[122] Для идентификации последовательностей ASO, которые подавляют экспрессию PIKFYVE в клетках человека, разрабатывали ASO (см. таблицу 2) и синтезировали в виде гэммеров MOE, которые содержат модификации сахара и связей, которые повышают устойчивость к нуклеазам и температуру плавления, сохраняя при этом возможность использования в качестве субстрата РНКазы H. Способность каждого ASO подавлять уровни РНК *PIKFYVE* тестировали с помощью трансфекции их в клетки 293Т эмбриональной почки человека с помощью липофектамина 2000 в концентрации 100 нМ и измерения экспрессии *PIKFYVE* через 7 дней после трансфекции. В качестве контроля использовали NCASO. Показанная относительная экспрессия *PIKFYVE* представляет собой среднее значение трех технических повторов, а значения рассчитывали с помощью нормализации к контролю *GAPDH*. В совокупности эти результаты, как показано на фиг. 1, показано, что несколько ASO, нацеленных на *PIKFYVE* (SEQ ID NO: 1-33, которые соответствуют ASO 1-33 на фигуре) подавляют экспрессию PIKFYVE в клетках человека.

Пример 2

[123] Подавление нецелевых генов, таких как *CNTN5*, предсказывали *in silico* для различных ASO, описанных в данном документе. Результаты представлены в таблице 3 ниже.

Таблица 3

| ASO | ген, комплементарно связывающий (-) цепь | ген, комплементарно связывающий (+) цепь | Ген, комплементарный связывающий полную цепь | Всего интронов | Всего экзонов |
|---------------------------------------|--|--|--|----------------|---------------|
| Тоферсен | 11 | 14 | 25 | 23 | 2 |
| Другой ASO, нацеленный на PIKFYVE, №1 | 11 | 11 | 22 | 22 | 0 |
| Другой ASO, нацеленный на PIKFYVE, №2 | 15 | 14 | 29 | 29 | 0 |
| ASO-2 (SEQ ID NO: 2) | 0 | 3 | 3 | 3 | 0 |

| | | | | | |
|--------------------------|---|----|----|----|---|
| ASO-4 (SEQ ID NO: 4) | 3 | 4 | 7 | 6 | 1 |
| ASO-13 (SEQ ID NO: 13) | 0 | 2 | 2 | 2 | 0 |
| ASO-20 (SEQ ID NO: 20) | 2 | 3 | 5 | 5 | 0 |
| ASO-21 (SEQ ID NO: 21) | 1 | 4 | 5 | 4 | 1 |
| ASO-26 (SEQ ID NO: 26) | 0 | 3 | 3 | 3 | 0 |
| ASO-27 (SEQ ID NO: 27) | 1 | 2 | 3 | 2 | 1 |
| ASO-29 (SEQ ID NO: 29) | 1 | 11 | 12 | 12 | 0 |
| ASO-105 (SEQ ID NO: 105) | 1 | 5 | 6 | 6 | 0 |

[124] Пять (5) нецелевых генов-кандидатов прогнозировали для ASO-520 (SEQ ID NO:520) на основе анализа последовательностей (по сравнению с 25 для тоферсена). Два из этих генов имеют очень низкую экспрессию в головном мозге и не обнаруживаются в индуцированных нейронах. Для оценки фактического нецелевого подавления остальных трех генов (ZNF385D, ERC2 и AKAP6), влияние обработки ASO-520 на экспрессию этих трех генов и *PIKFYVE* тестировали на линии нейронов, индуцированной пациентом, с помощью qPCR. ASO-520 существенно не влиял на их экспрессию в дозах, которые снижают *PIKFYVE* на 50%.

Пример 3

[125] В исследовании новорожденные трансгенные мыши *hPIKFYVE* ВАС получали 25 мкг отрицательного контроля ASO или тестируемого соединения с помощью интрацеребровентрикулярной (ICV) инъекции в P1 (постнатальный день 1), а образцы тканей собирали через 14 дней после обработки. Как показано на фиг. 2, протестированные ASO были мощными супрессорами *PIKFYVE*. При дозах от 0,0004 мкг до 25 мкг ASO-520 у мышей наблюдалось дозозависимое снижение уровня mRNA *PIKFYVE*.

Пример 4

[126] Мышиная модель TDP-43, в которой развивается нейродегенерация,

двигательные нарушения и паралич, использовалась для оценки эффективности подавления PIKFYVE. Wils *et al.*, “TDP-43 Transgenic Mice Develop Spastic Paralysis and Neuronal Inclusions Characteristic of ALS and Frontotemporal Lobar Degeneration.” *PNAS* 107(8):3858-63, 2010.

[127] Мышей дополнительно генетически модифицировали с делецией одной копии PIKFYVE. Эта делеция значительно восстановила двигательную функцию у мышей TDP-43, повышала среднюю выживаемость на 28% и снижала риск смерти (hR: соотношение рисков) на 73%. Делеция не вызывала каких-либо двигательных, когнитивных проблем или проблем со здоровьем у мышей дикого типа (WT).

[128] Интрацеребровентрикулярная инъекция в дозе 25 мкг ASO, нацеленного на mPIKFYVE, в день 1 постнатального периода (концентрация 5 мкг/мкл в центральной нервной системе) значимо снижала экспрессию PIKFYVE на ~50% по сравнению с ASO отрицательного контроля (NC). Эта обработка ASO, нацеленным на PIKFYVE, значимо улучшала двигательную функцию и выживаемость у мышей TDP-43 на уровнях, аналогичных уровням генетической делеции, и не изменяло функции у мышей WT. В 5 раз более низкая доза 5 мкг ASO, нацеленного на PIKFYVE, также значимо улучшила двигательную функцию и выживаемость при уровнях, аналогичных генетической делеции. Это привело к заключению, что ASO имеет по меньшей мере 5-кратное терапевтическое окно в этой модели.

[129] Гистологический анализ показал, что количество патологических агрегатов pTDP-43, повышенное у мышей TDP-43, значимо снижается при обработке ASO, нацеленным на mPIKFYVE, и полностью восстанавливается до уровня мышей WT. Общая локализация TDP-43, патологически локализованная в цитоплазме у мышей TDP-43, при обработке значимо перемещается в ядро. Количество двигательных нейронов в латеральном двигательном столбе области вентральных рогов спинного мозга было полностью восстанавливали до уровня WT у мышей, обработанных ASO, нацеленным на PIKFYVE.

Пример 5

[130] 35 мг ASO-520 вводили интратекально отличным от человека приматам раз в две недели в течение двух недель (2 дозы). Это привело к снижению mRNA PIKFYVE и подавлению PIKFYVE на 80%, как показано на фигуре 3, без каких-либо побочных эффектов (в том числе при гистопатологии головного и спинного мозга). (один выброс удаляли из данных РНК-секвенирования.)

Пример 6

[131] Определяли способность двигательных нейронов выживать в присутствии некодирующего ASO или AS-520 (SEQ ID NO: 520). На фиг. 4A показан процент выживаемости контрольных двигательных нейронов в присутствии некодирующего ASO (NC ASO) или C9ALS двигательных нейронов, полученных от пациента, в присутствии (i) NC ASO или (ii) AS-520. Более высокое количество двигательных нейронов, полученных от пациента с C9ALS, выживало в присутствии ASO-520, чем в присутствии NC ASO. На

фиг. 4В показано соотношение рисков для контрольных двигательных нейронов в присутствии NC ASO или полученных от пациента с C9ALS двигательных нейронов, в присутствии (i) NC ASO или (ii) AS-520 (SEQ ID NO: 520). Соотношение рисков полученных от пациента с C9ALS двигательных нейронов в присутствии AS-20 было значимо ниже, чем в присутствии NC ASO.

[132] Определяли способность корковых нейронов, полученных от пациента с FTD, выживать в присутствии некодирующего ASO или AS-520 (SEQ ID NO: 520). На фиг. 5А представлен график, показывающий вероятность выживания корковых нейронов, полученных от пациента с FTD, с MAPT V337V или V337M в присутствии NC ASO или AS-520 (SEQ ID NO: 520). AS-520 повышал вероятность выживания корковых нейронов MAPT V337M по сравнению с NC ASO. На фиг. 5В представлена гистограмма, изображающая соотношение рисков для корковых нейронов из контрольной группы, FTD, ассоциированной с C9orf72 (C9-FTD), спорадической FTD (sFTD) и FTD с патологией накопления тау-белка, ассоциированного с микротрубочками (MAPT) (MAPT-FTD) у пациентов, получавших лечение NC ASO или AS-520. AS-520 значимо снижал коэффициент риска в кортикальных нейронах C9-FTD, sFTD и MAPT-FTD.

[133] В настоящем изобретении представлены ASO, которые подавляют экспрессию *PIKFYVE* в клетках человека. Сопровождающие данные позволяют предположить, что эти ASO могут предупреждать нейродегенерацию у пациентов с ALS и FTD.

[134] Вышеизложенное описание и графические материалы следует рассматривать как только иллюстративные принципы настоящего изобретения. Настоящее изобретение не ограничивается предпочтительным вариантом осуществления и может быть реализовано различными способами, которые будут понятны специалисту в данной области техники. Специалистам в данной области техники легко будут понятны многочисленные применения настоящего изобретения. Поэтому нежелательно ограничивать настоящее изобретение конкретными раскрытыми примерами или точной показанной и описанной конструкцией и функционированием. Скорее, можно использовать все подходящие модификации и эквиваленты, входящие в объем настоящего изобретения. Все ссылки, цитированные в данном документе, включены посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Одноцепочечный антисмысловой олигонуклеотид, который подавляет экспрессию PIKFYVE, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет последовательность нуклеиновых оснований, которая содержит по меньшей мере 12 или 15 последовательных нуклеиновых оснований любой из последовательностей нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1-500.

2. Антисмысловой олигонуклеотид по п. 1, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет последовательность нуклеиновых оснований любой из SEQ ID NO: 1-500.

3. Антисмысловой олигонуклеотид по п. 1 или п. 2, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет от 18 до 20 связанных нуклеозидов.

4. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из предыдущих пунктов, в котором по меньшей мере одна межнуклеозидная связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь.

5. Антисмысловой олигонуклеотид по п. 4, в котором по меньшей мере одна модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную межнуклеозидную связь.

6. Антисмысловой олигонуклеотид по п. 4, в котором каждая модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную межнуклеозидную связь.

7. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из предыдущих пунктов, в котором по меньшей мере одна межнуклеозидная связь представляет собой фосфодизфирную межнуклеозидную связь.

8. Антисмысловой олигонуклеотид по п. 7, в котором по меньшей мере одна межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь и по меньшей мере одна межнуклеозидная связь представляет собой фосфодизфирную связь.

9. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из предыдущих пунктов, в котором по меньшей мере один нуклеозид содержит модифицированное нуклеиновое основание.

10. Антисмысловой олигонуклеотид по п. 9, в которой модифицированное нуклеиновое основание представляет собой 5-метилцитозин.

11. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из предыдущих пунктов, причем по меньшей мере один нуклеозид антисмыслового олигонуклеотида содержит модифицированный сахарный фрагмент.

12. Антисмысловой олигонуклеотид по п. 11, в котором модифицированный сахарный фрагмент содержит 2'-O-метоксиэтильную группу.

13. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из предыдущих пунктов, причем антисмысловой олигонуклеотид представляет собой гэммер.

14. Антисмысловой олигонуклеотид по п. 13, причем антисмысловой олигонуклеотид содержит:

гэм-сегмент, состоящий из 8-12 связанных дезоксинуклеозидов;
сегмент 5'-крыла, состоящий из 3-5 связанных нуклеозидов; и
сегмент 3'-крыла, состоящий из 3-5 связанных нуклеозидов,

При этом гЭп-сегмент расположен между сегментом 5'-крыла и сегментом 3'-крыла, и при этом нуклеозид каждого сегмента крыла содержит модифицированный сахарный фрагмент.

15. Антисмысловой олигонуклеотид по п. 14, в котором каждый нуклеозид каждого сегмента крыла содержит модифицированный сахарный фрагмент.

16. Антисмысловой олигонуклеотид по п. 14, в котором нуклеозиды, составляющие каждый сегмент крыла, содержат по меньшей мере два различных модифицированных сахарных фрагмента.

17. Антисмысловой олигонуклеотид по п. 14, в котором нуклеозиды, составляющие каждый сегмент крыла, содержат одинаковый модифицированный сахарный фрагмент.

18. Антисмысловой олигонуклеотид по п. 15, в котором модифицированный сахарный фрагмент содержит 2'-О-метоксиэтильную группу.

19. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из предыдущих пунктов, причем антисмысловой олигонуклеотид содержит от 15 до 50 нуклеозидов.

20. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из предыдущих пунктов, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет последовательность нуклеиновых оснований, которая содержит по меньшей мере 12 или 15 последовательных нуклеиновых оснований любой из последовательностей нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 501-533.

21. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из предыдущих пунктов, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет последовательность SEQ ID NO: 501-533.

22. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из предыдущих пунктов, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет последовательность SEQ ID NO: 520.

23. Фармацевтическая композиция, содержащая антисмысловой олигонуклеотид по любому из предыдущих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или вспомогательное вещество.

24. Фармацевтическая композиция по п. 23, причем фармацевтическая композиция составлена для парентеральной доставки.

25. Фармацевтическая композиция по п. 23, причем фармацевтическая композиция составлена для интрацеребровентрикулярной инъекции.

26. Способ лечения субъекта, имеющего неврологическое или нейродегенеративное заболевание, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества антисмыслового олигонуклеотида по любому из пп. 1-22 или фармацевтической композиции по любому из пп. 23-25.

27. Способ по п. 26, в котором неврологическое заболевание ассоциировано с гипервозбудимостью нейронов.

28. Способ по п. 26, в котором неврологическое заболевание ассоциировано с аберрантным эндосомальным транспортом.

29. Способ по п. 26, в котором неврологическое заболевание ассоциировано с аберрантным лизосомальным транспортом.

30. Способ по п. 26, в котором неврологическое заболевание выбрано из группы,

состоящей из семейного и спорадического бокового амиотрофического склероза (ALS), семейной и спорадической лобно-височной деменции (FTD), прогрессирующего супрануклеарного паралича, болезни Альцгеймера, хронической травматической энцефалопатии, болезни Паркинсона, болезни Шарко - Мари - Тута 2А и 4В, болезни Хантингтона, деменции, трансмиссивной губчатой энцефалопатии, спинобульбарной мышечной атрофии, дентаторубрально-паллидолуизовой атрофии, спиноцеребеллярной атаксии и болезни Крейтцфельда - Якоба.

31. Способ по п. 26, в котором неврологическое заболевание представляет собой семейный боковой амиотрофический склероз.

32. Способ по п. 26, в котором неврологическое заболевание представляет собой спорадический боковой амиотрофический склероз.

33. Способ по п. 26, в котором неврологическое заболевание представляет собой семейную лобно-височную деменцию.

34. Способ по п. 26, в котором неврологическое заболевание представляет собой спорадическую лобно-височную деменцию.

35. Способ по п. 26, в котором неврологическое заболевание представляет собой лобно-височную деменцию с патологией TDP-43.

36. Способ по п. 26, в котором неврологическое заболевание представляет собой лобно-височную деменцию с патологией тау-белка.

37. Способ по любому из пп. 26-36, в котором у субъекта имеется гаплонедостаточность по гену C9ORF72.

38. Способ по любому из пп. 26-36, в котором субъект имеет экспансию повтора GGGGCC в C9ORF72.

39. Способ по любому из пп. 26-36, в котором субъект имеет экспансию гексануклеотида (GGGGCC)_n в C9ORF72, где n равно по меньшей мере 30.

40. Способ по любому из пп. 26-36, в котором субъект имеет C9orf72-ассоциированную лобно-височную деменцию.

41. Способ по любому из пп. 26-36, в котором субъект имеет лобно-височную деменцию с патологией накопления тау-белка, ассоциированного с микротрубочками (МАРТ).

42. Способ по п. 41, в котором пациент имеет мутацию V337M в гене MART.

43. Способ ингибирования или подавления экспрессии PIKFYVE у пациента, имеющего неврологическое или нейродегенеративное заболевание, включающий введение эффективного количества антисмыслового олигонуклеотида по любому из пп. 1-22 или фармацевтической композиции по любому из пп. 23-25.

44. Олигонуклеотид, состоящий из 12-30 связанных нуклеозидов и имеющий последовательность нуклеиновых оснований, содержащую по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19 или по меньшей мере 20

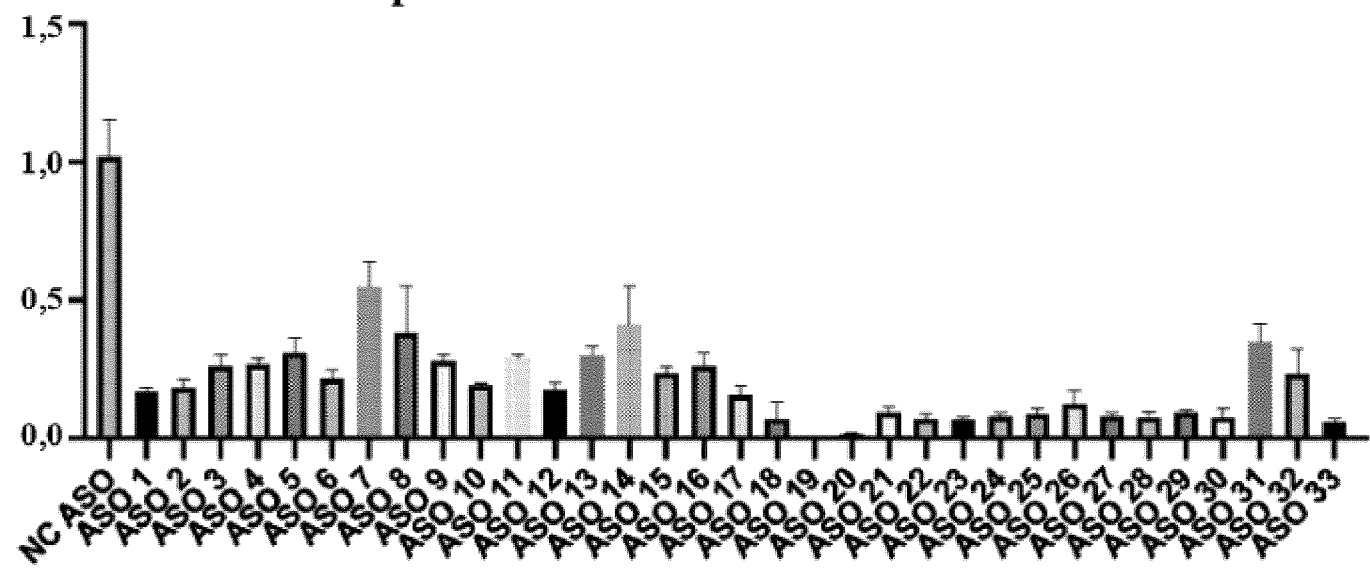
последовательных нуклеиновых оснований любой из последовательностей нуклеиновых оснований SEQ ID NO: 1-533.

По доверенности

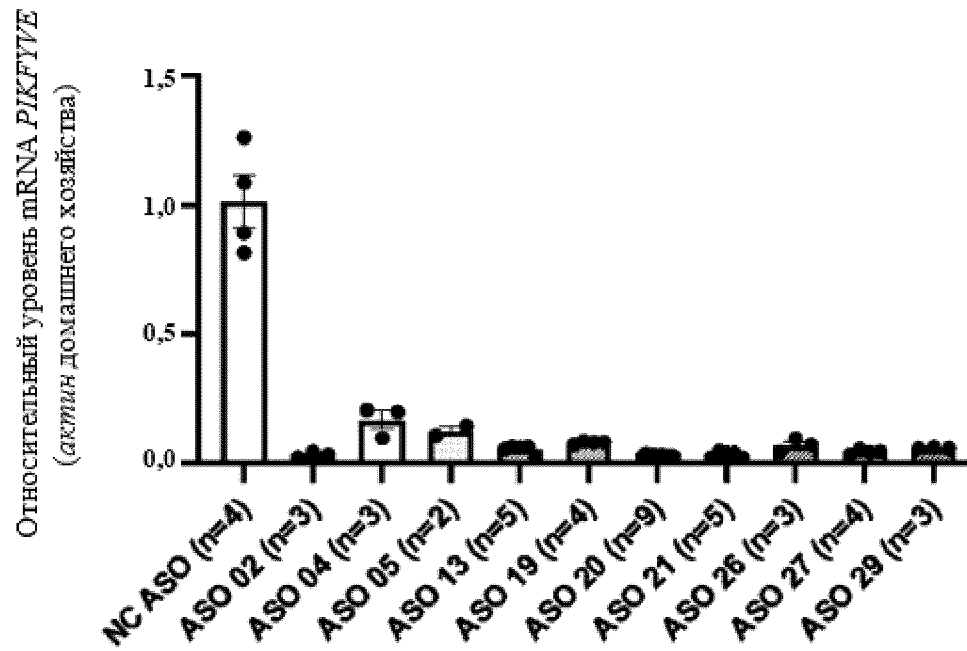
по отношению к уровню mRNA
(нормализовано по отношению к *GardH*)

Фиг. 1

Скрининг *ASO PIKFYVE* в HeLa

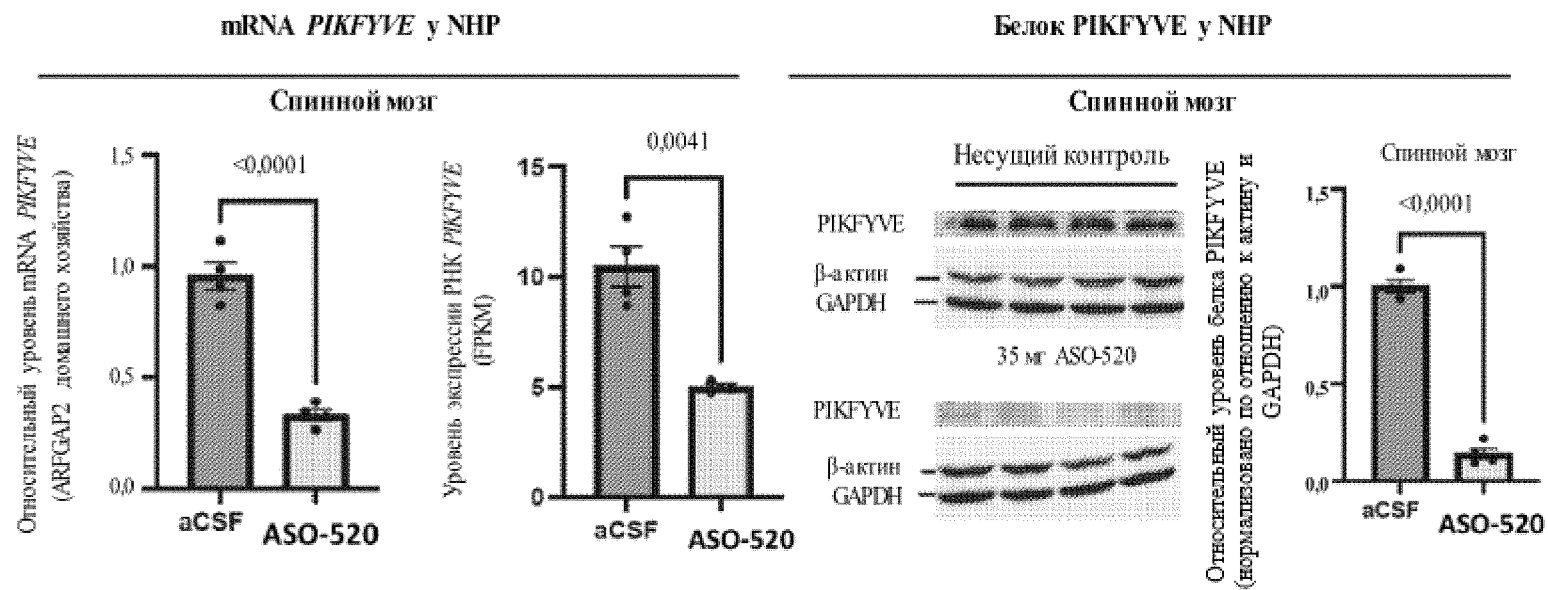


Все тестируемые группы имеют $p < 0,0001$ по сравнению с отрицательным контролем (NC) ASO. Обычный однофакторный анализ ANOVA

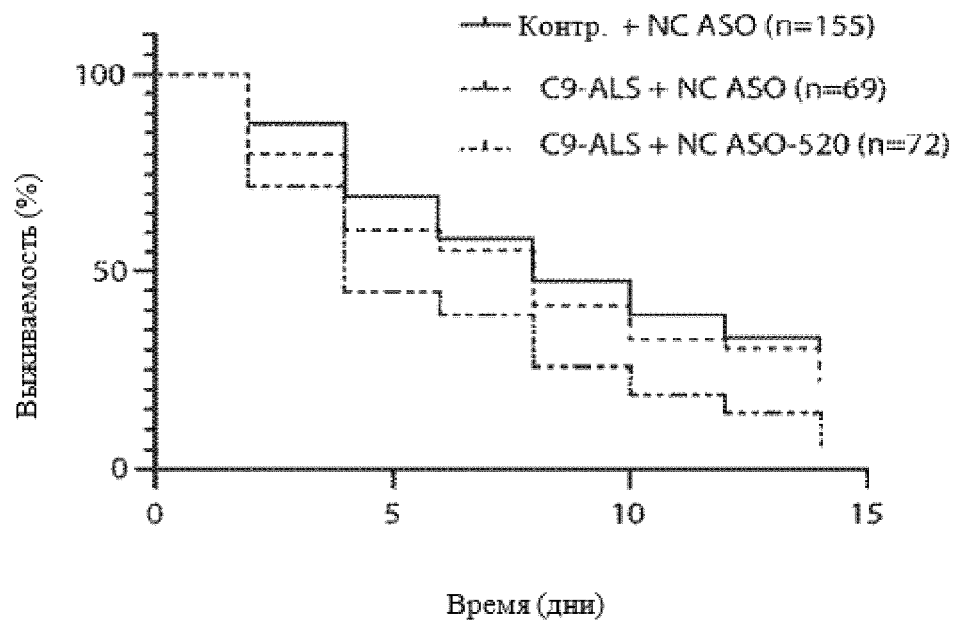


Все тестируемые группы имеют $p < 0,0001$ по сравнению с обычным однофакторным анализом ANOVA NCASO

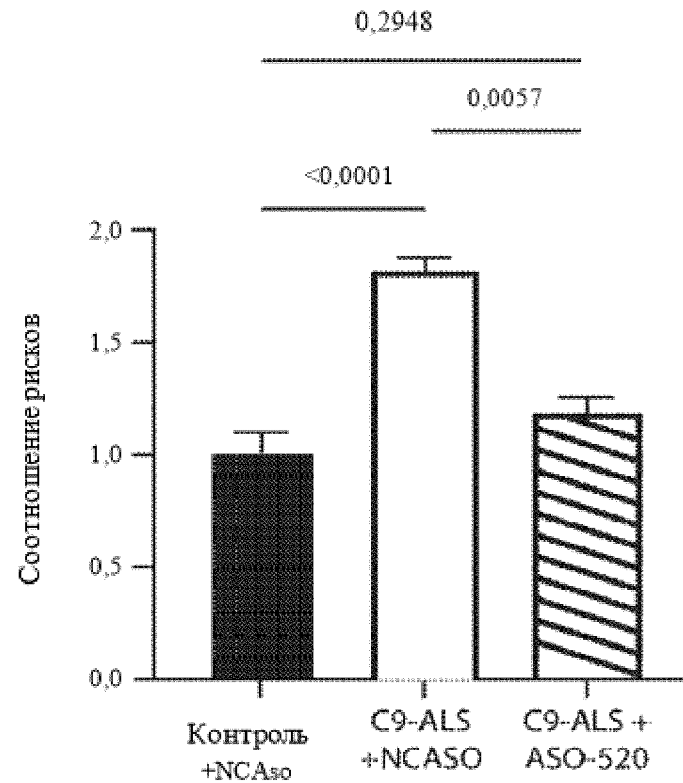
Фиг. 2



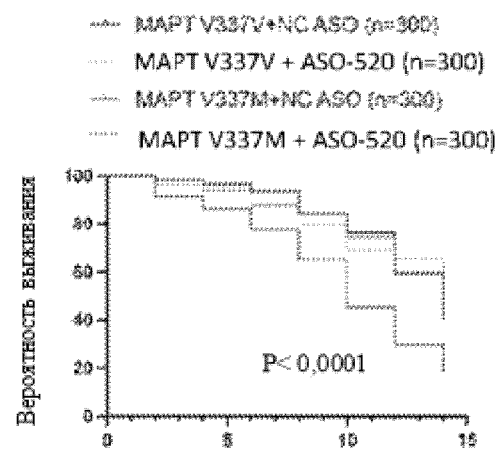
Фиг. 3



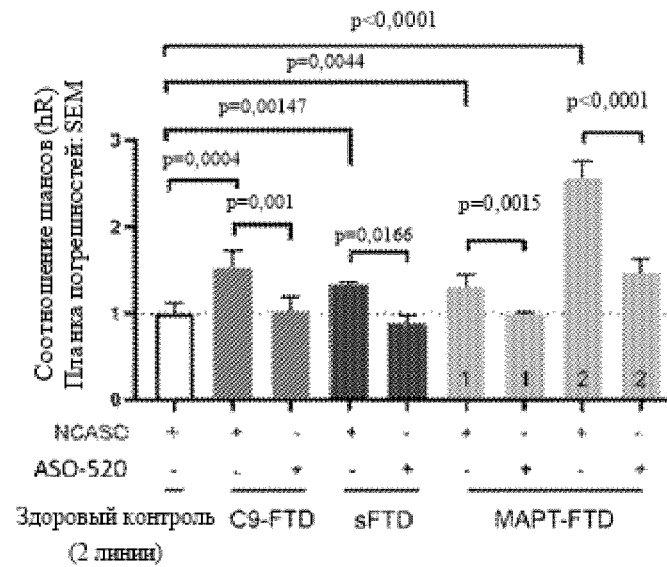
Фиг. 4А



Фиг. 4В



Фиг. 5А



Фиг. 5В