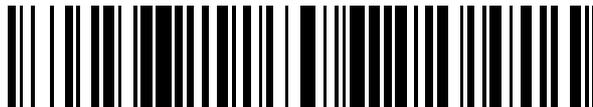


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 885**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2009 E 09714079 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013 EP 2260101**

54 Título: **Objetivos de microácido ribonucleico (miARN) y en dirección 3' para propósitos de diagnóstico y terapéuticos**

30 Prioridad:

27.02.2008 EP 08003570

27.02.2008 US 31835 P

03.03.2008 US 33340 P

19.02.2009 WO PCT/EP2009/051986

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

07.01.2014

73 Titular/es:

JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT

WÜRZBURG (100.0%)

Sanderring 2

97070 Würzburg, DE

72 Inventor/es:

THUM, THOMAS;

BAUERSACHS, JOHANN;

ENGELHARDT, STEFAN y

GROSS, CARINA

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 436 885 T3

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

DESCRIPCIÓN

OBJETIVOS DE MICROÁCIDO RIBONUCLEICO (MIARN) Y EN DIRECCIÓN 3' PARA PROPÓSITOS DE DIAGNÓSTICO Y TERAPÉUTICOS

5

Campo de la Invención

La presente invención se refiere al campo de microARN (miARN), en particular miR-21 y sus objetivos cadena abajo para el diagnóstico, prevención y/o terapia de fibrosis y otras enfermedades. La presente invención se refiere además a composiciones, métodos y usos para el tratamiento de fibrosis. Tales métodos comprenden modular e inhibir la actividad de un miARN en un sujeto que tiene fibrosis.

10

Antecedentes de la Invención

Los microARN son una clase amplia de ARN no codificantes pequeños que controlan diversos procesos biológicos que incluyen trayectorias de señalización mayores al regular la expresión de mRNA complementarios objetivos (Ambros, 2004). La desregulación de microARN en varias entidades mórbidas está causada por alteraciones en el genoma (Mi *et al.*, 2007), la expresión diferencial o infecciones víricas que en algunos casos cambia la función del microARN en supresores de tumor u oncogenes. Los microARN se implicaron recientemente en la regulación de diversas funciones cardíacas en una serie de estudios genéticos elegantes (Care *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007). Cheng *et al.* han demostrado que la modulación de la expresión de miR-21 mediante la depleción mediada en antisentido tiene un efecto negativo significativo sobre la hipertrofia de cardiomiocitos (American Journal of Pathology, vol. 170, págs. 1831-1840). Tatsuguchi *et al.* han demostrado que la inhibición de miR-18b o miR-21 endógeno aumenta el crecimiento hipertrófico (Journal of Molecular and Cellular Cardiology, vol. 42, páginas 1137-1141). Aunque estos estudios ayudan a delinear los papeles del microARN en la fisiología, crecimiento y morfogénesis del corazón, los mecanismos moleculares detallados para microARN en trayectorias de enfermedad *in vivo* no se conocen muy bien. Los antagonistas de microARN de oligonucleótido de hebra sencilla se ha mostrado que silencian los microARN endógenos *in vitro* e *in vivo* con efectos resultantes en el mRNA objetivo y niveles y metabolismo de proteína (Kruetzfeldt *et al.*, 2005; Esau *et al.*, 2006). Estos hallazgos apuntan a la aplicación de antagonistas de microARN para validación *in vivo* de función de microARN y, quizás de forma más importante, como una modalidad terapéutica novedosa.

15

20

25

30

COMPENDIO

La presente invención proporciona un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 hasta 30 nucleósidos ligados, en donde el oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase complementaria a miR-21 o un precursor del mismo, para uso en el tratamiento, prevención o diagnóstico de fibrosis en un sujeto.

35

La presente invención también proporciona un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 hasta 30 nucleósidos ligados, en donde la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es complementaria a miR-21 o un precursor del mismo, para uso en el tratamiento de un trastorno fibroproliferativo.

La presente invención también proporciona un método *in vitro* para diagnosticar fibrosis que comprende las etapas de:

(a) proporcionar una muestra obtenida de un paciente que se supone que padece de fibrosis;

40

(b) medir la expresión de miR-21;

en donde un nivel elevado de miR-21 en comparación con una muestra de control indica fibrosis o una predisposición a la misma.

La presente invención también proporciona un método *in vitro* para el cribado de un compuesto farmacéuticamente activo para el tratamiento y/o prevención de fibrosis o una predisposición a la misma, que comprende las etapas de:

45

a) proporcionar una muestra que contenga miR-21;

b) poner en contacto una sustancia candidata con la muestra;

c) determinar el efecto de la sustancia candidata sobre la muestra;

en donde una alteración de miR-21 indica un compuesto farmacéuticamente activo.

50

La presente invención se refiere a una región promotora de un microARN, el uso de un microARN, en particular miR-21, y elementos relacionados para el diagnóstico y para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de fibrosis y/o enfermedades relacionadas con fibrosis. Adicionalmente, la invención concierne a varios oligonucleótidos antisentido contra objetivos de miR-21. Una célula deficiente para miR-21, la región promotora y objetivos miR-21 y un organismo genomanipulado del mismo también se abarcan. Finalmente, la invención se dirige a un método para diagnosticar fibrosis y/o enfermedades relacionadas con fibrosis y a un método para seleccionar un

compuesto farmacéuticamente activo para el tratamiento de fibrosis y/o enfermedades relacionadas con fibrosis.

Se proporcionan en la presente métodos para tratar fibrosis, que comprenden administrar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene fibrosis un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 hasta 30 nucleósidos ligados y que tiene una secuencia de nucleobase complementaria a un miARN.

5 Se proporcionan en la presente métodos que comprenden identificar un sujeto que tiene o se sospecha que tiene fibrosis; y administrarle al sujeto un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 hasta 30 nucleósidos ligados, en donde la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es complementaria a un miARN o un precursor del mismo.

10 Se proporcionan en la presente métodos que comprenden administrar a un sujeto en riesgo de desarrollar fibrosis un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 hasta 30 nucleósidos ligados y que tiene una secuencia de nucleobase que es complementaria a un miARN o un precursor del mismo, por ello previniendo la fibrosis. En ciertas modalidades, la fibrosis es fibrosis hepática. En ciertas modalidades, la fibrosis es fibrosis pulmonar. En ciertas modalidades, la fibrosis es fibrosis de la piel. En ciertas modalidades, la fibrosis es fibrosis relacionada con la edad. En ciertas modalidades, la fibrosis es fibrosis cardíaca. En ciertas modalidades, la fibrosis es fibrosis renal. En ciertas modalidades, la fibrosis es fibrosis del bazo.

15 Se proporcionan en la presente métodos que comprenden administrar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene fibrosis un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 hasta 30 nucleósidos ligados y que tiene una secuencia de nucleobase que es complementaria a un miARN o un precursor del mismo, en donde el sujeto tiene al menos una enfermedad o afección cardíaca.

20 Se proporcionan en la presente métodos que comprenden identificar un sujeto que tiene o se sospecha que tiene fibrosis, en donde el sujeto tiene al menos una enfermedad o afección cardíaca; y administrarle al sujeto un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 hasta 30 nucleósidos ligados, en donde la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es complementaria a un miARN o un precursor del mismo.

25 En ciertas modalidades, la enfermedad o afección cardíaca se selecciona del grupo que consiste en hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca por hipertensión, insuficiencia cardíaca diastólica, insuficiencia cardíaca sistólica, enfermedad de almacenaje relacionada con el corazón, cardiomiopatía, pericarditis constrictiva, enfermedad de la arteria coronaria, infarto de miocardio agudo, infarto de miocardio crónico, insuficiencia cardíaca derecha, arritmias cardíacas, fibrosis relacionada con miocarditis, y enfermedad de la válvula cardíaca.

30 En ciertas modalidades la cardiomiopatía se selecciona del grupo que consiste en cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía hipertrófica con obstrucción, cardiomiopatía hipertrófica sin obstrucción, cardiomiopatía restrictiva, cardiomiopatía arritmogénica del ventrículo derecho, y cardiomiopatía diabética.

En ciertas modalidades la enfermedad de la válvula cardíaca se selecciona del grupo que consiste en estenosis de la válvula mitral, estenosis de la válvula aórtica, estenosis de la válvula tricúspide, y estenosis de la válvula pulmonar.

35 En ciertas modalidades la enfermedad de la válvula cardíaca se selecciona del grupo que consiste en insuficiencia de la válvula mitral, insuficiencia de la válvula aórtica, insuficiencia de la válvula tricúspide, e insuficiencia de la válvula pulmonar.

En ciertas modalidades los métodos proporcionados en la presente comprenden además administrar uno o más agentes farmacéuticos adicionales.

40 En ciertas modalidades la administración mejora el incremento del peso del corazón, dilatación ventricular izquierda, o disfunción del acortamiento fraccionado.

En ciertas modalidades la administración previene el incremento del peso del corazón, dilatación ventricular izquierda, o disfunción del acortamiento fraccionado.

En ciertas modalidades la administración mejora la función cardíaca.

45 En ciertas modalidades la administración comprende administración intravenosa, administración subcutánea, administración intraarterial, o administración intracardial.

Se proporcionan en la presente métodos para tratar fibrosis, que comprenden administrar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene fibrosis un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 hasta 30 nucleósidos ligados y que tiene una secuencia de nucleobase complementaria a un miARN o un precursor del mismo, en donde el sujeto tiene al menos una enfermedad o afección hepática.

50 Se proporcionan en la presente métodos que comprenden identificar un sujeto que tiene o se sospecha que tiene fibrosis, en donde el sujeto tiene al menos una enfermedad o afección hepática; y administrarle al sujeto un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 hasta 30 nucleósidos ligados, en donde la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es complementaria a un miARN o un precursor del mismo. En ciertas modalidades, al menos una enfermedad o afección hepática es lesión hepática crónica. En ciertas modalidades, al menos una enfermedad o afección hepática es infección por virus de hepatitis. En ciertas modalidades la infección por hepatitis es infección por virus de hepatitis C. En ciertas modalidades al menos una enfermedad o afección hepática es esteatohepatitis no alcohólica. En ciertas modalidades la administración comprende administración intravenosa o

administración subcutánea. En ciertas modalidades al menos una enfermedad o afección hepática es cirrosis. En ciertas modalidades la administración mejora la función hepática.

Se proporcionan en la presente métodos para tratar fibrosis, que comprenden administrar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene fibrosis un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 hasta 30 nucleósidos ligados y que tiene una secuencia de nucleobase complementaria a un miARN o un precursor del mismo, en donde el sujeto tiene al menos una enfermedad o afección pulmonar.

Se proporcionan en la presente métodos que comprenden identificar un sujeto que tiene o se sospecha que tiene fibrosis, en donde el sujeto tiene al menos una enfermedad o afección pulmonar; y administrarle al sujeto un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 hasta 30 nucleósidos ligados, en donde la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es complementaria a un miARN o un precursor del mismo. En ciertas modalidades la al menos otra enfermedad o afección pulmonar es enfermedad pulmonar obstructiva crónica. En ciertas modalidades la administración comprende administración pulmonar.

Se proporcionan en la presente métodos para tratar fibrosis, que comprenden administrar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene fibrosis un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 hasta 30 nucleósidos ligados y que tiene una secuencia de nucleobase complementaria a un miARN o un precursor del mismo, en donde el sujeto tiene al menos otra enfermedad o afección.

Se proporcionan en la presente métodos que comprenden identificar un sujeto que tiene o se sospecha que tiene fibrosis, en donde el sujeto tiene al menos otra enfermedad o afección; y administrarle al sujeto un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 hasta 30 nucleósidos ligados, en donde la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es complementaria a un miARN o un precursor del mismo. En ciertas modalidades la al menos otra enfermedad o afección es hipertensión pulmonar. En ciertas modalidades la al menos otra enfermedad o afección es una enfermedad relacionada con los vasos sanguíneos. En ciertas modalidades la enfermedad relacionada con los vasos sanguíneos se selecciona del grupo que consiste en rigidez arterial, esclerosis de la media (de Mönckeberg), y arterioesclerosis. En ciertas modalidades la al menos otra enfermedad o afección es esclerosis por gota. En ciertas modalidades la al menos otra enfermedad o afección es esclerosis sistémica. En ciertas modalidades la al menos otra enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en fibrosis retroperitoneal, fibrosis proliferativa, fibrosis neoplástica, fibrosis sistémica nefrogénica, fibrosis por inyección, fibrosis mediastínica, mielofibrosis, síndrome de dolor posterior a la vasectomía, artritis reumatoide.

En ciertas modalidades, la administración mejora la fibrosis. En ciertas modalidades, la administración hace más lento el progreso adicional de la fibrosis. En ciertas modalidades la administración detiene el progreso adicional de la fibrosis. En ciertas modalidades la administración reduce la fibrosis. En ciertas modalidades la administración reduce el contenido de colágeno.

Se proporcionan en la presente métodos para tratar un trastorno fibroproliferativo que comprenden administrar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno fibroproliferativo un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 hasta 30 nucleósidos ligados, en donde la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es complementaria a un miARN o un precursor del mismo, tratando así el trastorno fibroproliferativo.

En ciertas modalidades la administración comprende administración intravenosa, administración subcutánea, administración pulmonar, administración intraarterial, o administración intracardiaca.

Se proporcionan en la presente métodos para inhibir proliferación de fibroblastos que comprende poner en contacto un fibroblasto con un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 hasta 30 nucleósidos ligados, en donde la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es complementaria a un miARN o un precursor del mismo, inhibiendo así la proliferación de fibroblastos.

Se proporcionan en la presente métodos para estimular la apoptosis de fibroblastos que comprende poner en contacto un fibroblasto con un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 hasta 30 nucleósidos ligados, en donde la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es complementaria a miR-21 o un precursor del mismo, estimulando así la apoptosis de fibroblastos.

Se proporcionan en la presente métodos para incrementar la proteína Sprouty 1 en un fibroblasto que comprende poner en contacto el fibroblasto con un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 hasta 30 nucleósidos ligados, en donde la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es complementaria a un miARN o un precursor del mismo, estimulando así la expresión de proteína Sprouty 1.

Se proporcionan en la presente composiciones para inhibir MicroARN. En ciertas modalidades, el miARN es miR-21. En ciertas modalidades el oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase complementaria a una secuencia de nucleobase que es al menos 80% idéntica a miR-21 o un precursor del mismo. En ciertas modalidades miR-21 tiene la secuencia de nucleobase establecida como SEQ ID NO: 1. En ciertas modalidades el precursor miR-21 tiene la secuencia de nucleobase establecida como SEQ ID NO: 11.

En ciertas modalidades el oligonucleótido modificado consiste en de 12 hasta 30 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades el oligonucleótido consiste en 12 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades el oligonucleótido modificado consiste en 13 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades el oligonucleótido modificado consiste en 14

nucleósidos ligados. En ciertas modalidades el oligonucleótido modificado consiste en de 15 hasta 24 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades el oligonucleótido modificado consiste en 15 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades el oligonucleótido modificado consiste en 16 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades el oligonucleótido modificado consiste en 17 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades el oligonucleótido modificado consiste en 18 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades el oligonucleótido modificado consiste en 19 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades el oligonucleótido modificado consiste en 20 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades el oligonucleótido modificado consiste en 21 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades el oligonucleótido modificado consiste en 22 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades el oligonucleótido modificado consiste en 23 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades el oligonucleótido modificado consiste en 24 nucleósidos ligados.

En ciertas modalidades la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado tiene no más de dos alineaciones erróneas para la secuencia de nucleobase de miR-21 o un precursor del mismo. En ciertas modalidades la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado tiene no más de una alineación errónea para la secuencia de nucleobase de miR-21 o un precursor del mismo. En ciertas modalidades la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado no tiene alineaciones erróneas para la secuencia de nucleobase de miR-21 o un precursor del mismo.

En ciertas modalidades la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado comprende al menos 15 nucleobases contiguas de la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 12. En ciertas modalidades la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado comprende al menos 16 nucleobases contiguas de la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 12. En ciertas modalidades la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado comprende al menos 17 nucleobases contiguas de la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 12. En ciertas modalidades la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado comprende al menos 18 nucleobases contiguas de la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 12. En ciertas modalidades la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado comprende al menos 19 nucleobases contiguas de la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 12. En ciertas modalidades la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado comprende al menos 20 nucleobases contiguas de la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 12. En ciertas modalidades la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado comprende al menos 21 nucleobases contiguas de la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 12. En ciertas modalidades la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado comprende al menos 22 nucleobases contiguas de la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 12.

En ciertas modalidades la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado consiste en la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 12.

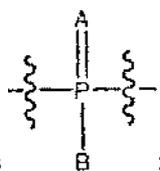
En ciertas modalidades, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado conjugado a un ligando. En ciertas modalidades tiene la estructura (III)



(III)

en donde

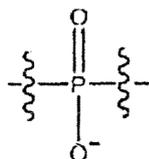
Cada Q es independientemente un nucleósido modificado por 2'-O-metilo;



x es

Uno de A y B es S mientras que el otro es O;

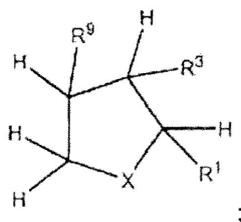
y es



Cada uno de z^1 , z^2 , z^3 , y z^4 es independientemente x o y;

n = 6-17

L es



En donde:

X es $N(CO)R^7$, o NR^7 ;

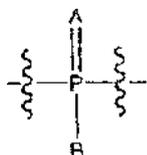
5 Cada uno de R^1 , R^3 y R^9 , es independientemente, H, OH, o $-CH_2OR^b$ con la condición de que al menos uno de R^1 , R^3 y R^9 sea OH y al menos uno de R^1 , R^3 y R^9 sea $-CH_2OR^b$;

R^7 es R^d o alquilo C_1-C_{20} sustituido con NR^cR^d o $NHC(O)R^d$;

R^c es H o alquilo C_1-C_6 ;

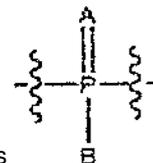
R^d es un radical carbohidrato; o un radical esteroide, que se ata opcionalmente a al menos un radical carbohidrato; y

R^b es



10

Siendo S uno de entre A y B mientras que el otro es O.



En ciertas modalidades, R^d es colesterol. En ciertas modalidades, cada uno de z^1 , z^2 , z^3 , y z^4 es uno de entre A y B mientras que el otro es O.

siendo S

15

En ciertas modalidades, R^1 es $-CH_2OR^b$. En ciertas modalidades, R^9 es OH. En ciertas modalidades, R^1 y R^9 son *trans*. En ciertas modalidades, R^1 y R^3 son *trans*. En ciertas modalidades, R^3 es $-CH_2OR^b$. En ciertas modalidades, R^1 es OH. En ciertas modalidades, R^1 y R^3 son *trans*. En ciertas modalidades, R^3 y R^9 son *trans*. En ciertas modalidades, R^9 es CH_2OR^b . En ciertas modalidades, X es $NC(O)R^7$. En ciertas modalidades, R^7 es $-CH_2(CH_2)_3CH_2NHC(O)R^d$.

20

En ciertas modalidades, al menos una ligadura internucleósido es una ligadura internucleósido modificada. En ciertas modalidades, cada ligadura internucleósido es una ligadura internucleósido modificada. En ciertas modalidades, al menos una ligadura internucleósido es una ligadura internucleósido de fosforotioato. En ciertas modalidades, cada ligadura internucleósido es una ligadura internucleósido de fosforotioato. En ciertas modalidades, al menos un nucleósido comprende un azúcar modificado. En ciertas modalidades, una pluralidad de nucleósidos comprende un azúcar modificado. En ciertas modalidades, cada nucleósido comprende un azúcar modificado. En ciertas modalidades, cada nucleósido comprende un azúcar modificado por 2'-O-metoxietilo. En ciertas modalidades, cada uno de una pluralidad de nucleósidos comprende un azúcar de 2'-O-metoxietilo y cada uno de una pluralidad de nucleósidos comprende un azúcar de 2'-fluro. En ciertas modalidades, cada azúcar modificado se selecciona independientemente de un azúcar de 2'-O-metoxietilo, un azúcar de 2'-fluro, un azúcar de 2'-O-metilo, o una porción de azúcar bicíclica. En ciertas modalidades, al menos un nucleósido comprende una nucleobase modificada. En ciertas modalidades, la nucleobase modificada es una 5-metilcitosina. En ciertas modalidades, al menos un nucleósido comprende una citosina, en donde la citosina es una 5-metilcitosina. En ciertas modalidades, cada citosina es una 5-metilcitosina.

30

35

40

En ciertas modalidades, la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es al menos 90% complementaria a la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 1. En ciertas modalidades, la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es al menos 95% complementaria a la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 1. En ciertas modalidades, la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es 100% complementaria a la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 1. En ciertas modalidades, la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado tiene propiedad complementaria de longitud completa a la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 1. En ciertas modalidades, la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es al menos 90% complementaria a la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 11. En ciertas modalidades, la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es al menos 95% complementaria a la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 11. En ciertas modalidades, la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es 100% complementaria a la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO:

11. En ciertas modalidades, la secuencia de nucleobase miR-21 consiste en la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 1. En ciertas modalidades, la secuencia de nucleobase precursora consiste en la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 11.

En ciertas modalidades, el compuesto que comprende el oligonucleótido modificado se prepara como una composición farmacéutica. En ciertas modalidades, el oligonucleótido modificado se prepara como una composición farmacéutica.

En ciertas modalidades, el compuesto consiste en un oligonucleótido modificado. En ciertas modalidades, el oligonucleótido modificado es un oligonucleótido modificado de hebra sencilla. En ciertas modalidades, el oligonucleótido modificado es un oligonucleótido antisentido.

Se proporcionan en la presente composiciones para uso en el tratamiento, prevención, y/o mejora de fibrosis. Además se proporcionan en la presente compuestos que comprenden oligonucleótidos modificados que tienen una secuencia de nucleobase complementaria a miARN, para uso en el tratamiento, prevención, y/o mejora de fibrosis.

Se proporcionan en la presente oligonucleótidos antisentido complementarios a miR-21 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de fibrosis.

Se proporcionan en la presente oligonucleótidos antisentido complementarios a miR-21 para uso en el tratamiento y/o prevención de fibrosis.

Se proporciona en la presente el uso de miR-21 y/o un oligonucleótido antisentido contra miR-21 para el tratamiento de fibrosis.

Se proporciona en la presente el uso de miR-21 y/o un oligonucleótido antisentido contra miR-21 para el diagnóstico de fibrosis.

Breve Descripción de las Figuras

Fig. 1 Desregulación de miR-21 en enfermedad cardiaca y expresión predominante en fibroblastos cardiacos

(a) Análisis de expresión microARN por microensayos. El ARN se aisló del miocardio ventricular izquierdo de un modelo murino de insuficiencia cardiaca (ratones β 1AR-TG) en las etapas temprana (tres meses de edad), moderada (seis meses de edad) y tardía (doce meses) de insuficiencia cardiaca. La expresión se presenta como regulación de pliegue frente a controles de tipo natural. miR-21 se marca en rojo. Los datos son de 3-4 hibridaciones independientes por grupo.

(b) *Izquierda.* Análisis Northern Blot de expresión de miR-21 en etapas diferentes de insuficiencia cardiaca en ratones β 1AR-TG. *Derecha.* Análisis cuantitativo de los datos del panel superior.

(c) *Izquierda.* Análisis Northern Blot de expresión de miR-21 en miocardio ventricular humano izquierdo con falla y sin falla. *Derecha.* Análisis cuantitativo de la forma madura de miR-21 en miocardio ventricular humano izquierdo con falla y sin falla.

(d) *Superior.* Cardiomiocitos neonatales teñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y un anticuerpo dirigido contra α -actinina después de la transfección con miR mezclado (control-pre-miR, 50 nM, 72 h), miR-21 sintético (pre-miR-21, 50 nM, 72 h) y un inhibidor miR-21 (anti-miR-21, 50 nM, 72 h). Los cardiomiocitos se cultivaron bajo condiciones de control (ver Métodos Suplementarios) o estimularon con FCS (5%) por 48 h. *Inferior.* Análisis cuantitativo de tamaños de cardiomiocito individuales (análisis de histograma). $n > 200$ los cardiomiocitos se analizaron por grupo.

(e) *Superior.* Generación de ratones transgénicos que expresan miR-21 bajo el control del promotor alfa-MHC. *Media.* Northern Blot de miR-21 maduro en animales tipo silvestre (TS) y transgénicos (TG). *Inferior.* Áreas cardiacas transversales de ratones transgénicos miR-21 y tipo silvestre teñidos para determinar la morfología general (tinción HE) y deposición de colágeno (rojo Sirius).

(f) Expresión de miR-21 en fibroblastos cardiacos y los cardiomiocitos. Northern Blot (*Superior*) y análisis PCR en tiempo real cuantitativo (*Inferior*). Todas las barras de error indican SEM, $n = 3-6$ para a-f.

Fig. 2 Inhibición de Sprouty1 a través de miR-21 que reduce la señalización ERK y aumenta la supervivencia del fibroblasto

(a) Corazones de ratones Spry1LacZ +/- se tiñeron con X-gal. Los análisis macroscópicos (*superior*) y microscópicos (*inferior*) muestran la detección de LacZ en fibroblastos cardiacos. La barra negra corta representa 100 μ m. La barra negra grande representa 10 μ m.

(b, c) *Superior.* Detección de SPRY1, ERK1/2 y fosfo-ERK1/2 en ventrículos izquierdos humanos con falla (b) y después de la transfección de cardiomiocitos y fibroblastos co-cultivados con microARN mezclado (Pre-miRTM negativo Control #2, 50 nM, 72h), miR-21 sintético (pre-miR-21, 50 nM, 72 h) o un inhibidor miR-21 (anti-miR-21, 50 nM, 72 h). *Inferior.* Análisis cuantitativo de resultados de Western Blotting.

(d) *Superior.* Determinación de SPRY1, ERK1/2, fosfo-ERK1/2 después de inactivación mediada por siARN de SPRY1 (150 nM, 72 h) o tratamiento con siARN mezclado (150 nM, 72 h) de las células cardiacas co-cultivadas. *Inferior.* Análisis cuantitativo de resultados de Western Blotting.

(e) *Superior*. Análisis FACS de fibroblastos cardiacos positivos en anexina V después de tratamiento con microARN mezclado (control-pre-miR, 100 nM, 72 h), miR-21 sintético (pre-miR-21, 100 nM, 72 h), antagonistas miR-21 (anti-miR-21, 100 nM, 72 h) o controles respectivos (100 nM, 72 h). *Inferior*. Análisis cuantitativo de células positivas en anexina V y después de tratamientos respectivos.

5 (f) *Superior*. Concentración de FGF2 en sobrenadantes de fibroblastos cardiacos cultivados después de tratamiento con microARN mezclado (control pre-miR, 100 nM, 72 h), miR-21 sintético (pre-miR-21, 100 nM, 72 h) o antagonistas miR-21 (anti-miR-21, 100 nM, 72 h) o *Inferior*, después de inactivación mediada por siARN de SPRY1 (150 nM, 72 h) o tratamiento con siARN mezclado (150 nM, 72 h). Todas las barras de error indican SEM. n=3- 6 para a-f.

Fig. 3 Silenciamiento terapéutico de miR-21 in vivo previene la fibrosis cardiaca e insuficiencia cardiaca

10 (a) *Superior*. Detección microscópica fluorescente de teñido Cy3 y DAPI en tejido cardiaco ventricular izquierdo después de inyección de oligonucleótido modificado etiquetado con Cy3 a través de la vena yugular. Controles reciben inyecciones PBS. *Inferior*. Ratones sometidos a constricción transaórtica (TAC) u operación simulada se inyectaron con control (PBS, 200µl) o antagomir-21 (200µl; 80mg/kg/d) 24 h después de la operación por tres días consecutivos.

15 (b) *Superior*. Análisis Northern Blot de expresión de miR-21 en ratones tratados con antagomir-21 y no tratados (control) después de TAC. *Inferior*. Análisis cuantitativo de expresión de miR-21 cardiaca.

(c) *Superior*. Análisis Western Blot de SPRY1, ERK1/2 y fosfo-ERK1/2 en ratones después de operación simulada o después de TAC tratado ya sea con control o antagomir-21. La expresión de G beta se mostró como un control constitutivo. *Inferior*. Análisis cuantitativo de resultados de Western Blot.

20 (d) Secciones cardiacas después de teñido con rojo Sirius para detección de fibrosis del miocardio en ratones tratados con antagomir-21 y de control.

(e) Análisis cuantitativo de fibrosis del miocardio (*izquierda*) y peso del corazón/corporal (*derecha*) en ratones tratados con antagomir-21 y de control.

25 (f) *Superior*. Análisis de transcriptoma global del genoma de ratón en tejido cardiaco de ratones después de operación simulada o después de ser tratado con TAC con control o antagomir-21. Los cuadros rojos (verdes) muestran genes que inducen de forma importante ($p < 0.05$) (reprimidos). *Inferior*. Normalización de genes sobrerregulados codificados para proteínas involucradas en fibrosis al miocardio después de TAC por tratamiento con antagomir-21.

(g) Análisis ecocardiográfico. LVD, diámetro ventricular izquierdo; FS, acortamiento fraccionado.

(h) El mecanismo propuesto subraya la desrepresión de señalización ERK cardiaca a través de inhibición mediada por miR-21 de SPRY1. Todas las barras de error indican SEM, n=3-6 para las figuras a-g.

30 Fig. 4 Regulación transcripcional de miR-21

(a) Conservación de secuencia dentro de las regiones promotoras de miR-21 de diferentes especies en comparación al promotor humano miR-21. Las barras indican el grado de conservación.

(b) Actividad de luciferasa de constructos del promotor miR-21 humano. Acortamiento progresivo del promotor nativo lleva a la identificación de una región de 117 bp que es responsable de la expresión de miR-21. n=3.

35 (c) Datos de luciferasa de constructos del promotor miR-21 humano después de eliminación/ mutación de sitios enlazados al factor de transcripción individual. n=3.

Fig. 5 Eliminación del miR-21 expresado ubicuamente induce un fenotipo cardiaco en pez cebra

(a) *Izquierda*. Vista lateral de embriones de control MO y morfantes miR-21 a 80 hpf. A, atrio; V, ventrículo; las flechas oscuras resaltan edema pericardiano.

40 *Superior Derecha*. Corazones inyectados con morfolino de control (control MO) exhiben morfología cardiaca normal a 80 horas después de la fertilización (hpf). Los corazones se tuercen, las capas endocardiales y miocárdicas están bien desarrolladas y el ventrículo (V) y atrio (A) se separan por el anillo atrio-ventricular (AV). *Inferior*. Morfantes miR-21 (MO-1 inyectado) desarrollan edema pericardiano debido a la pérdida de capacidad de contracción ventricular y exhiben extremos acortados, mientras que el desarrollo de otros sistemas de órganos continúa normalmente.

45 (b) Inhibición de función miR-21 por dos oligonucleótidos antisentido modificados por morfolino diferentes (MO-1, n=496 y MO-2, n=460) lleva a fenotipos idénticos en > 90% de los embriones inyectados. Los datos son de 3 inyecciones independientes por grupo.

50 (c) Función miocárdica exhibida como acortamiento fraccionado (FS) de la cámara ventricular de MO-control (n=6) y morfantes miR-21 inyectados por dos morfolinolinos diferentes (MO-1, n=8 y MO-2, n=8) a 48, 72, 96 y 120 hpf. FS ventricular de ventrículos morfantes miR-21 se reduce severamente con el tiempo.

Fig. 6 Eficacia de transfección en los cardiomiocitos cultivados

(a) Cardiomiocitos neonatales cultivados se transfectaron con miR-21 etiquetado con Cy-3 (50 nM, 72 h, Ambion, EE. UU.) y teñidos con DAPI (*derecha*). Para comparación los cardiomiocitos cultivados se tiñeron con DAPI solo (*izquierda*).

(b) Análisis Northern Blot de expresión de miR-21 en los cardiomiocitos cultivados después de la transfección con microARN mezclado (control-pre-miR, 50 nM, 72 h), un inhibidor miR-21 (anti-miR-21, 50 nM, 72 h), o miR-21 sintético (pre-miR-21, 50 nM, 72 h).

Todas las barras de error indican SEM; n=3-6 para a) y b).

5 Fig. 7 Sitios enlazados a microARN dentro del 3'UTR del gen *Spry1*

Superior. Cambio en la expresión de varios microARN con sitios de enlace dentro del 3'UTR del gen *Spry1*.

Inferior. microARN con sitios de enlace dentro del 3'UTR analizados por microconfiguración microARN se presentan en gris. Cds=secuencia de codificación

Fig. 8 datos de expresión de PCR en tiempo real miR-21

10 Además de la determinación por Northern Blotting, la expresión de miR-21 se analizó por PCR en tiempo real en tejido ventricular izquierdo de ratones después de operación simulada, tratamiento simulación+antagomir-21, TAC y tratamiento TAC+antagomir-21 (*izquierda*), así como en corazones de ratones de tipo silvestre y ratones transgénicos miR-21 (*derecha*). n=4-6 por grupo.

Datos no mostrados:

15 Una selección para objetivos miR-21 teóricos revela 22 genes objetivo potenciales conocidos, de los cuales 8 se mostraron para expresarse dentro del tejido cardíaco. La combinación de tres herramientas de predicción objetivo diferentes identifica *Spry1* (*Sprouty1*) como un candidato altamente posible.

Regulación transcripcional de miR-21

20 Hay una conservación de secuencia dentro de las regiones promotoras de miR-21 de diferentes especies en comparación al promotor miR-21 humano. Se mostró la actividad de luciferasa de constructos promotor miR-21 humano después de eliminación/mutación de sitios de unión del factor de transcripción individual. El acortamiento progresivo del promotor nativo lleva a la identificación de una región de 117 bp que es responsable de la expresión de miR-21. n=3.

Eficacia de transfección en los cardiomiocitos cultivados

25 Los cardiomiocitos neonatales cultivados se transfectaron con miR-21 etiquetado con Cy-3 (50 nM, 72 h, Ambion, EE.UU.) y teñidos con DAPI. Para comparación los cardiomiocitos cultivados se tiñeron con DAPI solo. Se analizó el Northern Blotting de expresión de miR-21 en los cardiomiocitos cultivados después de la transfección con microARN mezclado (control-pre-miR, 50 nM, 72 h), un inhibidor miR-21 (anti-miR-21, 50 nM, 72 h), o miR-21 sintético (pre-miR-21, 50 nM, 72 h).

Sitios de unión de microARN dentro del 3.UTR del gen *Spry1*

30 Hay un cambio en la expresión de varios microARN con sitios de unión dentro del 3'UTR del gen *Spry1*. Los microARN con sitios de enlace dentro del 3'UTR se analizaron por microconfiguración microARN.

Datos de expresión de PCR en tiempo real de miR-21

35 Además de la determinación por Northern Blotting, la expresión de miR-21 se analizó por PCR en tiempo real en tejido ventricular izquierdo de ratones después de operación simulada, tratamiento simulación+antagonista miR-21, TAC y tratamiento TAC+antagonista miR-21, así como en corazones de ratones de tipo silvestre y ratones transgénicos miR-21.

Descripción Detallada

Definiciones

40 "Fibrosis" significa la formación o desarrollo de tejido conectivo fibroso en exceso en un órgano o tejido. En ciertas modalidades, la fibrosis ocurre como un proceso reparador o reactivo. En ciertas modalidades, la fibrosis ocurre en respuesta a daño o lesión. El término "fibrosis" se entiende como la formación o desarrollo de tejido conectivo fibroso en exceso en un órgano o tejido como un proceso reparador o reactivo, contrario a una formación de tejido fibroso como un constituyente normal de un órgano o tejido.

45 Un oligonucleótido antisentido se entiende como un oligonucleótido que tiene una cierta secuencia complementaria a otra secuencia, en particular una secuencia complementaria a miR-21. Un objetivo de miR-21 también puede entenderse como que abarca un objetivo cadena abajo de miR-21. Es importante notar que una inhibición de miR-21, por ejemplo por medio de un oligonucleótido con una secuencia al menos complementaria a miR-21 llevará a una desrepresión o incluso a una sobreexpresión de objetivos de miR-21, tipo *Sprouty* y similares.

"Sujeto" significá un animal humano o no humano seleccionado para tratamiento o terapia.

50 "Sujeto que se sospecha que tiene" significa un sujeto que exhibe uno o más indicadores clínicos de una enfermedad o afección.

"Sujeto que se sospecha que tiene fibrosis" significa un sujeto que exhibe uno o más indicadores clínicos de fibrosis.

"Prevenir" o "prevención" se refiere a retardar o anticipar el inicio, desarrollo o progreso de una afección o enfermedad por un periodo de tiempo, incluyendo semanas, meses, o años.

"Tratamiento" o "tratar" significa la aplicación de uno o más procedimientos específicos usados para la cura o mejora de una enfermedad. En ciertas modalidades, el procedimiento específico es la administración de uno o más agentes farmacéuticos.

"Mejora" significa una disminución de la severidad de al menos un indicador de una afección o enfermedad. En ciertas modalidades, mejora incluye un retardo o aletargo en el progreso de uno o más indicadores de una afección o enfermedad. La severidad de los indicadores puede determinarse por mediciones subjetivas u objetivas que se conocen por aquellos expertos en la técnica.

"Sujeto que necesita del mismo" significa un sujeto identificado como que necesita una terapia o tratamiento.

"Administrar" significa proporcionar un agente o composición farmacéutica a un sujeto, e incluye, pero no se limita a, administrar por un profesional médico y auto administrar.

"Administración parenteral," significa administración a través de inyección o infusión.

Administración parenteral incluye, pero no se limita a, administración subcutánea, administración intravenosa, administración intramuscular, administración intraarterial, y administración intracraneal.

"Administración subcutánea" significa administración justo debajo de la piel.

"Administración intravenosa" significa administración en una vena.

"Administración intraarterial" significa administración en una arteria.

"Administración intracardial" significa administración en el corazón. En ciertas modalidades, administración intracardial ocurre por medio de un catéter. En ciertas modalidades, administración intracardial ocurre por medio de cirugía a corazón abierto.

"Administración pulmonar" significa administración a los pulmones.

"Mejora la función hepática" significa los cambios a la función hepática hacia parámetros normales. En ciertas modalidades, la función hepática se evalúa al medir moléculas encontradas en la sangre de un sujeto. Por ejemplo, en ciertas modalidades, la función hepática mejorada se mide por una reducción en niveles de transaminasa hepática en la sangre.

"Composición farmacéutica" significa una mezcla de sustancias apropiadas para administrar a un individuo que incluye un agente farmacéutico. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender un oligonucleótido modificado y una solución acuosa estéril.

"Agente farmacéutico" significa una sustancia que proporciona un efecto terapéutico cuando se administra a un sujeto.

"Ingrediente farmacéutico activo" significa la sustancia en una composición farmacéutica que proporciona un efecto deseado.

"Ácido nucleico objetivo," "ARN objetivo," "transcripto de ARN objetivo" y "objetivo del ácido nucleico" todos significan cualquier ácido nucleico capaz de ser el objetivo de compuestos antisentido.

"Direccionado" significa el proceso de diseño y selección de una secuencia de nucleobase que hibridizará a un ácido nucleico objetivo e inducirá un efecto deseado.

"Dirigido a" significa que tiene una secuencia de nucleobase que permitirá la hibridización a un ácido nucleico objetivo para inducir un efecto deseado. En ciertas modalidades, un efecto deseado es la reducción de un ácido nucleico objetivo.

"Modulación" significa una perturbación de la función o actividad. En ciertas modalidades, modulación significa un incremento en la expresión de genes. En ciertas modalidades, modulación significa una reducción en la expresión de genes.

"Expresión" significa cualquiera de las funciones y etapas por las cuales la información de codificación de genes se convierte en estructuras presentes y que operan en una célula.

"Sitio objetivo 5'" se refiere a la nucleobase de un ácido nucleico objetivo que es complementaria a la nucleobase más cercana a 5' de un oligonucleótido particular.

"Sitio objetivo 3'" significa la nucleobase de un ácido nucleico objetivo que es complementaria a la nucleobase más cercana a 3' de un oligonucleótido particular.

"Región" significa una porción de nucleósidos ligados dentro de un ácido nucleico. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase que es complementaria a una región de un ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, en ciertas modalidades de este tipo un oligonucleótido modificado es complementario a una región de una secuencia de bucle madre de miARN. En ciertas modalidades de este tipo, un oligonucleótido

modificado es 100% para una región de una secuencia de bucle madre de miARN.

"Segmento" significa una porción más pequeña o sub-porción de una región.

"Secuencia de nucleobase" significa el orden de nucleobases contiguas, en una orientación 5' a 3', independiente de cualquier modificación de azúcar, ligadura, y/o nucleobase.

5 "Nucleobases contiguas" significa nucleobases inmediatamente adyacentes la una a la otra en un ácido nucleico.

"Complementariedad de nucleobase" significa la capacidad de dos nucleobases para emparejarse no covalentemente por medio de puentes de hidrógeno.

10 "Complementariedad" significa que una primera secuencia de nucleobase es al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idéntica, o es 100% idéntica, al complemento de una segunda secuencia de nucleobase sobre una región de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más nucleobases, o que las dos secuencias hibridizan bajo condiciones de hibridación severas. En ciertas modalidades un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobase que es 100% complementaria a un miARN, o precursor del mismo, puede no ser 100% complementaria al miARN, o precursor del mismo, sobre la longitud completa del oligonucleótido modificado.

15 "Complementariedad" significa la capacidad para emparejar la nucleobase entre un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico.

20 "Complementariedad de longitud completa" significa que cada nucleobase de un primer ácido nucleico es capaz de emparejarse con cada nucleobase en una posición correspondiente en un segundo ácido nucleico. Por ejemplo, en ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado en donde cada nucleobase tiene complementariedad a una nucleobase en un miARN, tiene complementariedad de longitud completa al miARN.

25 "Porcentaje de complementariedad" significa el número de nucleobases de complementariedad en un ácido nucleico dividido por la longitud del ácido nucleico. En ciertas modalidades, porcentaje de complementariedad de un oligonucleótido modificado significa el número de nucleobases que son complementarias al ácido nucleico objetivo, dividido por el número de nucleobases del oligonucleótido modificado. En ciertas modalidades, el porcentaje de complementariedad de un oligonucleótido modificado significa el número de nucleobases que son complementarias a un miARN, dividido por el número de nucleobases del oligonucleótido modificado.

30 "Porcentaje de región enlazada" significa el porcentaje de una región complementaria a una región de oligonucleótido. El porcentaje de región enlazada se calcula al dividir el número de nucleobases de la región objetivo que son complementarias al oligonucleótido por la longitud de la región objetivo. En ciertas modalidades, el porcentaje de región enlazada, es al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%.

"Porcentaje de identidad" significa el número de nucleobases en el primer ácido nucleico que son idénticas a las nucleobases en las posiciones correspondientes en un segundo ácido nucleico, dividido por el número total de nucleobases en el primer ácido nucleico.

35 "Sustancialmente idéntica" usando en la presente puede significar que una primera y segunda secuencia de nucleobase son al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idéntica, o 100% idéntica, sobre una región de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más nucleobases.

40 "Hibridizar" significa la combinación en pares base de ácido nucleicos complementarios que ocurre a través de complementariedad de nucleobase.

"Alineación errónea" significa una nucleobase del primer ácido nucleico que no es capaz de emparejarse con una nucleobase en una posición correspondiente de un segundo ácido nucleico.

"Nucleobase sin complementariedad" significa dos nucleobases que no son capaces de emparejarse a través de enlace hidrógeno.

45 "Idéntico" significa que tiene la misma secuencia de nucleobase.

"miARN" o "miR" significa un ARN no codificante de entre 18 y 25 nucleobases en longitud que hibridiza a y regula la expresión de un ARN codificante. En ciertas modalidades, un miARN es el producto de desdoblamiento de un pre-miARN por la enzima Dicer. Los ejemplos de miARN se encuentran en la base de datos de miARN conocida como miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>).

50 "Pre-miARN" o "pre-miR" significa un ARN no codificante que tiene una estructura de horquilla, que contiene un miARN. En ciertas modalidades, un pre-miARN es el producto de desdoblamiento de un pri-miR por la ribonucleasa específica de ARN de hebra doble conocida como Drosha.

55 "Secuencia de bucle madre" significa un RNA que tiene una estructura de horquilla y que contiene una secuencia de miARN madura. Las secuencias pre-miARN y secuencias de bucle madre pueden solaparse. Los ejemplos de secuencias de bucle madre se encuentran en la base de datos de miARN conocida como miRBase

[\(http://microna.sanger.ac.uk/\)](http://microna.sanger.ac.uk/).

"Pri-miARN" o "pri-miR" significa un ARN no codificante que tiene una estructura de horquilla que es un sustrato para la ribonucleasa específica de ARN de hebra doble Drosha.

5 "MiARN precursor" significa un transcripto que se origina de un ADN genómico y que comprende un ARN estructurado, no codificado que comprende una o más secuencias miARN. Por ejemplo, en ciertas modalidades un miARN precursor es un pre-miARN. En ciertas modalidades, un miARN precursor es un pri-miARN.

"Transcripto monocistrónico" significa un miARN precursor que contiene una secuencia miARN sencilla.

"Transcripto policistrónico" significa un miARN precursor que contiene dos o más secuencias miARN.

"Región de semilla" significa nucleótidos 2 hasta 6 o 2 hasta 7 desde el extremo 5' de una secuencia de miARN madura.

10 "Compuesto oligomérico" significa un compuesto que comprende un polímero de subunidades monoméricas ligadas.

"Oligonucleótido" significa un polímero de nucleósidos ligados, cada uno de los cuales puede estar modificado o no modificado, independientemente uno del otro.

"Ligadura internucleósido que se presenta naturalmente" significa una ligadura fosfodiéster 3' a 5' entre nucleósidos.

"Azúcar natural" significa un azúcar encontrado en ADN (2'-H) o ARN (2'-OH).

15 "Nucleobase natural" significa una nucleobase que es no modificada con relación a su forma que se presenta naturalmente.

"Ligadura internucleósido" significa una ligadura covalente entre nucleósidos adyacentes.

"Nucleósidos ligados" significa nucleósidos unidos por una ligadura covalente.

"Nucleobase" significa una porción heterocíclica capaz de emparejarse no covalentemente con otra nucleobase.

20 "Nucleósido" significa una nucleobase ligada a un azúcar.

"Nucleótido" significa un nucleósido que tiene un grupo fosfato ligado covalentemente a la porción de azúcar de un nucleósido.

25 "Antagonista miR" significa un oligonucleótido modificado complementario a miARN, o un precursor del mismo. Por ejemplo, "antagonista miR-X" significa un oligonucleótido modificado que tiene complementariedad de nucleobase a miR-X. En ciertas modalidades, un antagonista es un antagonista miR21.

"Oligonucleótido modificado" significa un oligonucleótido que tiene una o más modificaciones con relación a un extremo, azúcar, nucleobase y/o ligadura internucleósido que se presenta naturalmente.

"Oligonucleótido modificado de hebra sencilla" significa un oligonucleótido modificado que no se hibridiza a una hebra de complementariedad.

30 "Ligadura internucleósido modificada" significa cualquier cambio de una ligadura internucleósido que se presenta naturalmente.

"Ligadura internucleósido fosforotioato" significa una ligadura entre nucleósidos donde uno de los átomos que no pertenecen al puente es un átomo de azufre.

"Azúcar modificada" significa sustitución y/o cualquier cambio de un azúcar natural.

35 "Nucleobase modificada" significa cualquier sustitución y/o cambio desde una nucleobase natural.

"5-metilcitosina" significa una citosina modificada con un grupo metilo enlazado a la posición 5'.

"Azúcar de 2'-O-metilo" o "azúcar de 2'-OMe" significa un azúcar que tiene una modificación o-metilo en la posición 2'.

"Azúcar 2'-O-metoxietilo" o "azúcar 2'-MOE" significa un azúcar que tiene una modificación O-metoxietilo en la posición 2'.

40 "Azúcar 2'-O-fluoro" o "azúcar 2'-F" significa un azúcar que tiene una modificación fluoro en la posición 2'.

"Porción de azúcar bicíclica" significa un azúcar modificado por el puente entre dos átomos de anillo no geminales.

"Nucleósido 2'-O-metoxietilo" significa un nucleósido modificado en 2' que tiene una modificación de azúcar de 2'-O-metoxietilo.

"Nucleósido 2'-fluoro" significa un nucleósido modificado en 2' que tiene una modificación de azúcar de 2'-fluoro.

45 "Nucleósido 2'-O-metilo" significa un nucleósido modificado en 2' que tiene una modificación de azúcar de 2'-O-metilo.

"Nucleósido bicíclico" significa un nucleósido modificado en 2' que tiene una porción de azúcar bicíclica.

"Motivo" significa un patrón de nucleobases modificadas y/o no modificadas, azúcares, y/o ligaduras internucleósido en

un oligonucleótido.

Un "oligonucleótido completamente modificado" significa que se modifica cada nucleobase, cada azúcar, y/o cada ligadura internucleósido.

5 Un "oligonucleótido uniformemente modificado" significa que tienen la misma modificación cada nucleobase, cada azúcar, y/o cada ligadura internucleósido a través del oligonucleótido modificado.

10 Una "modificación estabilizante" significa una modificación a un nucleósido que proporciona estabilidad aumentada a un oligonucleótido modificado, en presencia de nucleasas, con relación a la que se proporciona por 2'-deoxinucleósidos ligados por ligaduras fosfodiéster internucleósido. Por ejemplo, en ciertas modalidades, una modificación estabilizante es una modificación de nucleósido estabilizante. En ciertas modalidades, una modificación estabilizante es una modificación de ligadura internucleósido.

Un "nucleósido estabilizante" significa un nucleósido modificado para proporcionar estabilidad de nucleasa aumentada a un oligonucleótido, con relación a la que proporciona un 2'-deoxinucleósido. En una modalidad, un nucleósido estabilizante es un nucleósido modificado en 2'.

15 Una "ligadura internucleósido estabilizante" significa una ligadura internucleósido que proporciona estabilidad de nucleasa aumentada a un oligonucleótido con relación a la que se proporciona por una ligadura internucleósido fosfodiéster. En una modalidad, una ligadura internucleósido estabilizante es una ligadura internucleósido de fosforotioato.

Generalidades

20 Se describe en la presente que los oligonucleótidos modificados complementarios a miR-21 son agentes farmacéuticos para la inhibición de miR-21. En ciertas modalidades, los oligonucleótidos modificados se administran a un sujeto que tiene una enfermedad caracterizada por la sobreexpresión de miR-21. En ciertas modalidades, la enfermedad es cáncer. En ciertas modalidades, la enfermedad es insuficiencia cardíaca. En ciertas modalidades, la enfermedad es fibrosis. La fibrosis resulta del desarrollo de tejido conectivo fibroso en exceso en un órgano o tejido en respuesta a daño o lesión. Si no se trata, la fibrosis puede llevar a una variedad de afecciones del corazón, pulmones, riñón, hígado, y piel, entre otros tejidos.

30 Se describe en la presente que miR-21 derivado del fibroblasto juega un papel crítico en la fibrosis. El aumento de los niveles de miR-21 promueve la supervivencia de fibroblastos, mientras que la supresión de miR-21 endógeno induce la muerte celular apoptótica. De esta manera, se identifica en la presente un mecanismo por el cual miR-21 regula la supervivencia de fibroblastos. La proliferación de fibroblastos aberrante y la supervivencia pueden llevar a fibrosis. En consecuencia, los oligonucleótidos modificados complementarios a miR-21 son agentes farmacéuticos para el tratamiento de fibrosis. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado complementario a miR-21 es un oligonucleótido antisentido complementario a miR- 21.

35 Los inventores demuestran un papel crítico de miR-21 derivado de fibroblasto y SPRY1 en el corazón (Fig. 3h). Los datos sugieren que la activación mediada por miARN e inducida por tensión de la actividad ERK-MAPcinasa puede regular de forma importante la fibrosis cardíaca. Este estudio representa el primer ejemplo de una aplicación terapéutica de microARN en un modelo de enfermedad. El miR-21 específicamente antagonizado previene el deterioro estructural y funcional en un modelo murino. Estos hallazgos sugieren un punto de entrada terapéutico nuevo para la insuficiencia cardíaca y muestran el amplio potencial terapéutico de antagonistas microARN.

40 En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de miR-21, un oligonucleótido antisentido contra miR-21 y/o un objetivo de miR-21 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de fibrosis y/o enfermedades relacionadas con fibrosis.

45 La invención concierne particularmente a enfermedades específicas cardíacas que involucran fibrosis (= enfermedades relacionadas con fibrosis), tipo hipertrofia cardíaca, enfermedad cardíaca hipertensa, insuficiencia cardíaca sistólica y diastólica, enfermedades de almacenaje relacionadas con el corazón, tales como M. Fabry, cardiomiopatías, por ejemplo cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía hipertrófica con y sin obstrucción, cardiomiopatía restrictiva, cardiomiopatía arritmogénica del ventrículo derecho y otras formas de cardiomiopatía, por ejemplo, cardiomiopatía diabética, pericarditis constrictiva, enfermedad de la arteria coronaria, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca derecha aguda y crónica, arritmias cardíacas debido a fibrosis, fibrosis relacionada con miocarditis, enfermedades de las válvulas cardíacas que lleva a estenosis o insuficiencia de válvulas (por ejemplo esclerosis), por ejemplo estenosis e/o insuficiencia de la válvula mitral, estenosis e/o insuficiencia de válvula aórtica, estenosis e/o insuficiencia de la válvula tricúspide, estenosis e/o insuficiencia de la válvula pulmonar.

55 En un aspecto adicional la invención concierne a otras enfermedades que involucran fibrosis (= enfermedades relacionadas con fibrosis), no relacionadas con el sistema cardíaco. Los ejemplos no limitantes son fibrosis pulmonar, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, hipertensión pulmonar, fibrosis hepática debido a un ambiente tóxico, hepatitis y/o insuficiencia cardíaca derecha a secundaria, fibrosis de la piel, por ejemplo desarrollo de queloides después de lesión, enfermedades relacionadas con los vasos sanguíneos, tal como rigidez arterial relacionada con la edad o hipertensión, esclerosis de la media (de Mönckeberg), arterioesclerosis, fibrosis relacionada con la edad de diferentes

órganos, esclerosis por gota, por ejemplo, durante la enfermedad de Crohn, esclerosis sistémica y síndrome CREST etc., fibrosis renal, fibrosis neoplásica y/o artritis reumatoide.

Otras enfermedades y trastornos relacionados con fibrosis conocidos son por ejemplo endofibrosis al miocardio y miocardiopatía idiopática, cirrosis que puede resultar de fibrosis del hígado, fibrosis pulmonar idiopática del pulmón, enfermedad pulmonar parenquimal difusa, fibrosis mediastínica, mielofibrosis, síndrome de dolor posterior a la vasectomía, fibrosis retroperitoneal y fibrosis sistémica nefrogénica.

Todos los aspectos de la invención, en particular los aspectos mencionados en las reivindicaciones adjuntas pueden usarse para el diagnóstico, tratamiento y/o prevención de las enfermedades, trastornos y afecciones arriba mencionadas, que se dan como ejemplos posibles. La lista no es limitante.

En una modalidad, la invención se refiere a estrategias para modular miR-21. En otra modalidad, la invención se refiere a estrategias para modular, por ejemplo, sobreexpresar y/o sobreregular objetivos de miR-21. Las modulaciones posibles son dispositivos implantables, tipo vectores víricos y formulaciones liposomales, etc., sistemas de transferencia de genes, esponjas y similares.

Sprouty (SPRY1) se identifica en la presente como un objetivo de miR-21. Tanto miR-21 como SPRY1 se expresan en fibroblastos cardiacos, entre otros tipos de células. La expresión incrementada de miR-21 en fibroblastos cardiacos induce una represión fuerte de la expresión de proteína SPRY y además incrementa la activación de ERK-MAPcinasa. En una modalidad preferida el objetivo se selecciona del grupo que consiste en Sprouty1 (SPRY1), en particular SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, Tgfb1, Krit1, Pitx2, Fasl, Nfib, Lnx1 y Rtn4.

En un aspecto la presente invención se refiere a un oligonucleótido antisentido contra (o complementario a) SEQ ID NO: 2 hasta SEQ ID NO: 4, Sprouty1 (SPRY1), en particular SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, Tgfb1, Krit1, Pitx2, Fasl, Nfib, Lnx1 y/o Rtn4 para el diagnóstico, tratamiento y/o prevención de fibrosis y/o enfermedades relacionadas con fibrosis. En ciertos aspectos, un oligonucleótido antisentido complementario a un objetivo seleccionado del grupo que consiste en Sprouty1 (SPRY1), en particular SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, Tgfb1, Krit1, Pitx2, Fasl, Nfib, Lnx1 y/o Rtn4, interfiere con la capacidad de un microARN, tal como miR-21, para unirse a un sitio objetivo e inhibe la expresión del objetivo seleccionado. En ciertos aspectos, tal oligonucleótido antisentido comprende una o más modificaciones de nucleósido.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una célula deficiente para miR-21, SEQ ID NO: 2 hasta SEQ ID NO: 4, Sprouty1 (SPRY1), en particular SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, Tgfb1, Krit1, Pitx2, Fasl, Nfib, Lnx1 y/o Rtn4.

En un aspecto la invención se refiere a un organismo genomanipulado mamífero no humano deficiente para miR-21, SEQ ID NO: 2 hasta SEQ ID NO: 4, Sprouty1 (SPRY1), en particular SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, Tgfb1, Krit1, Pitx2, Fasl, Nfib, Lnx1 y/o Rtn4 como un modelo de enfermedad para fibrosis y/o enfermedades relacionadas con fibrosis. También se abarcan animales transgénicos, en particular mamíferos no humanos que sobreexpresan miR-21.

Se describe en la presente que miR-21 derivado de fibroblasto contribuye para la insuficiencia cardiaca. El análisis de las muestras de tejido cardiaco ventricular izquierdo de sujetos con insuficiencia cardiaca en etapa terminal debido a cardiomiopatía dilatada idiopática revela una expresión incrementada de miR-21 y reprime la expresión de proteína SPRY1. Adicionalmente, la ERK-MAPcinasa se activó en muestras de estos sujetos, como se hace evidente por un incremento en la relación fósforo-ERK/ERK. Se describe en la presente que en un modelo animal de insuficiencia cardiaca la administración de un oligonucleótido modificado complementario a miR-21 resulta en una atenuación importante de fibrosis cardiaca. La insuficiencia cardiaca es caracterizada por, entre otros parámetros, fibrosis cardiaca. En consecuencia, los oligonucleótidos modificados complementarios a miR-21 son agentes farmacéuticos para el tratamiento de fibrosis cardiaca.

También se ha descubierto en la presente que en un modelo animal de insuficiencia cardiaca, la atenuación de fibrosis cardiaca va acompañada por la atenuación del incremento del peso del corazón. Además, la evaluación de la función cardiaca por ecocardiografía revela que la administración de un oligonucleótido modificado complementario a miR-21 previene la dilatación ventricular izquierda y normaliza los parámetros de acortamiento fraccionado. La insuficiencia cardiaca puede ser caracterizada por, entre otros parámetros, el incremento del peso del corazón, dilatación ventricular izquierda, y disfunción del acortamiento fraccionado. En consecuencia, los oligonucleótidos modificados complementarios a miR-21 son agentes terapéuticos para el tratamiento, mejora, y prevención de insuficiencia cardiaca asociada con fibrosis cardiaca.

En un aspecto la presente invención se refiere a una región promotora de un microARN (miARN) que comprende una modificación de una proteína de elemento de respuesta calcio/cAMP (CREB, por sus siglas en inglés) y/o sitio de enlace del factor de respuesta al suero (SRF, por sus siglas en inglés) para diagnóstico, prevención y/o terapia de fibrosis y/o enfermedades relacionadas con fibrosis.

En una modalidad, la región promotora, el gen de miR-21 por sí mismo y/o el 3'UTR de varios ARN mensajeros puede contener polimorfismos, mutaciones, en particular mutaciones de punto, eliminaciones, truncaciones e/o inversión. Todas estas enmiendas a la secuencia de tipo natural llevan a la formación nueva de un sitio de enlace miR-21 novedoso o a la eliminación de un sitio de enlace miR-21. En otra modalidad la modificación de la región promotora se selecciona del grupo que consiste en una mutación de punto, una truncación, una eliminación y una inversión. Además, la región promotora puede seleccionarse del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 hasta SEQ ID NO: 4.

Aplicaciones de Diagnóstico

5 En un aspecto la presente invención se refiere al uso de miR-21, un oligonucleótido antisentido contra miR-21 y/o un objetivo de miR-21 para el diagnóstico de fibrosis y/o enfermedades relacionadas con fibrosis. Un oligonucleótido antisentido se entiende como un oligonucleótido que tiene una cierta secuencia complementaria a otra secuencia, en particular una secuencia complementaria a miR-21. Un objetivo de miR-21 también puede entenderse para abarcar un objetivo cadena abajo de miR-21. Es importante notar que una inhibición de miR-21, por ejemplo por medio de un oligonucleótido con una secuencia al menos complementaria a miR-21 llevará a una desrepresión o incluso a una sobreexpresión de objetivos de miR-21, tipo Sprouty y similares.

En un aspecto la invención se refiere a un método para diagnosticar fibrosis y/o enfermedades relacionadas con fibrosis que comprende las etapas de:

10 (a) proporcionar una muestra de un paciente que se supone que padece de fibrosis y/o enfermedades relacionadas con fibrosis;

(b) medir la expresión de miR-21, Sprouty1 (SPRY1), en particular SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, Tgfb1, Krit1, Pitx2, Fasl, Nfib, Lnx1 y/o Rtn4;

15 en donde un nivel elevado de miR-21 y/o un nivel reducido de Sprouty1 (SPRY1), en particular SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, Tgfb1, Krit1, Pitx2, Fasl, Nfib, Lnx1 y/o Rtn4 en comparación a una muestra de control indica fibrosis y/o enfermedades relacionadas con fibrosis o una predisposición a la misma.

En un aspecto la presente invención se refiere a un método para seleccionar un compuesto farmacéuticamente activo para el tratamiento y/o la prevención de fibrosis y/o enfermedades relacionadas con fibrosis o una predisposición a la misma, que comprende las etapas de:

20 (a) Proporcionar una muestra que contiene miR-21, Sprouty1 (SPRY1), en particular SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, Tgfb1, Krit1, Pitx2, Fasl, Nfib, Lnx1 y/o Rtn4;

(b) Poner en contacto la sustancia candidato con la muestra;

25 (c) Determinar el efecto de la sustancia candidato en la muestra; en donde una alteración de miR-21, Sprouty1 (SPRY1), en particular SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, Tgfb1, Krit1, Pitx2, Fasl, Nfib, Lnx1 y/o Rtn4 indica un compuesto farmacéuticamente activo.

Ciertas Enfermedades y Afecciones

30 Se proporcionan en la presente métodos para tratar un sujeto que tiene o se sospecha que tiene fibrosis. También se proporcionan métodos para tratar a un sujeto identificado como que tiene o se sospecha que tiene fibrosis. En ciertas modalidades, tales métodos comprenden administrar a un sujeto un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobase complementaria a miARN o un precursor del mismo. En ciertas modalidades, el miARN es miR-21.

Además se proporcionan en la presente métodos para prevenir fibrosis en un sujeto en riesgo de desarrollar fibrosis. En ciertas modalidades, tales métodos comprenden administrar a un sujeto en riesgo de desarrollar fibrosis un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobase complementaria a un miARN o un precursor del mismo. En ciertas modalidades, el miARN es miR-21.

35 En ciertas modalidades, la fibrosis es fibrosis hepática. En ciertas modalidades, la fibrosis es fibrosis pulmonar. En ciertas modalidades la fibrosis es fibrosis de la piel. En ciertas modalidades la fibrosis es fibrosis cardiaca. En ciertas modalidades la fibrosis es fibrosis renal. En ciertas modalidades la fibrosis es fibrosis pulmonar. En ciertas modalidades la fibrosis es fibrosis relacionada con la edad. En ciertas modalidades la fibrosis es fibrosis del bazo.

40 En ciertas modalidades, el sujeto que tiene o se sospecha que tiene fibrosis tiene al menos una enfermedad o afección cardiaca. En ciertas modalidades, el sujeto identificado como que tiene o se sospecha que tiene fibrosis tiene al menos una enfermedad o afección cardiaca. En ciertas modalidades, tales métodos comprenden administrar a un sujeto un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobase complementaria a un miARN o un precursor del mismo. En ciertas modalidades, el miARN es miR-21.

45 En ciertas modalidades, una enfermedad o afección cardiaca es hipertrofia cardiaca. En ciertas modalidades, una enfermedad o afección cardiaca es cardiomiopatía. En ciertas modalidades, cardiomiopatía es cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía hipertrófica con obstrucción, cardiomiopatía hipertrófica sin obstrucción, cardiomiopatía restrictiva, cardiomiopatía arritmogénica del ventrículo derecho, o cardiomiopatía diabética.

50 En ciertas modalidades, una enfermedad o afección cardiaca es enfermedad de la arteria coronaria. En ciertas modalidades, una enfermedad o afección cardiaca es enfermedad de almacenaje relacionada con el corazón, pericarditis constrictiva, infarto de miocardio agudo, infarto de miocardio crónico, arritmia cardiaca, o fibrosis relacionada con miocarditis.

En ciertas modalidades, una enfermedad o afección cardiaca es insuficiencia cardiaca. En ciertas modalidades, insuficiencia cardiaca es insuficiencia cardiaca por hipertensión, insuficiencia cardiaca diastólica, insuficiencia cardiaca sistólica, o insuficiencia cardiaca derecha.

55 En ciertas modalidades, una enfermedad o afección cardiaca es enfermedad de la válvula cardiaca. En ciertas modalidades, enfermedad de la válvula cardiaca es estenosis de la válvula mitral, estenosis de la válvula aórtica,

estenosis de la válvula tricúspide, o estenosis de la válvula pulmonar. En ciertas modalidades, la enfermedad de la válvula cardiaca es insuficiencia de la válvula mitral, insuficiencia de la válvula aórtica, insuficiencia de la válvula tricúspide, o insuficiencia de la válvula pulmonar.

Se proporcionan en la presente métodos para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene fibrosis, en donde el sujeto tiene una enfermedad o afección hepática. En ciertas modalidades, un sujeto identificado como que tiene o se sospecha que tiene fibrosis tiene al menos una enfermedad o afección hepática. En ciertas modalidades, tales métodos comprenden administrar a un sujeto un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobase complementaria a un miARN o un precursor del mismo. En ciertas modalidades, el miARN es miR-21. En ciertas modalidades, una enfermedad o afección hepática es lesión hepática crónica. En ciertas modalidades, una enfermedad o afección hepática es infección por virus de hepatitis. En ciertas modalidades, una infección por hepatitis es infección por virus de hepatitis C. En ciertas modalidades una enfermedad o afección hepática es esteatohepatitis no alcohólica. En ciertas modalidades una enfermedad o afección hepática es cirrosis.

Se proporcionan en la presente métodos para el tratamiento de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene fibrosis, en donde el sujeto tiene al menos una enfermedad o afección pulmonar. También se proporcionan en la presente métodos para el tratamiento de un sujeto identificado como que tiene o se sospecha que tiene fibrosis, en donde el sujeto tiene al menos una enfermedad o afección pulmonar. En ciertas modalidades, tales métodos comprenden administrar a un sujeto un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobase que es complementaria a un miARN o un precursor del mismo. En ciertas modalidades, el miARN es miR-21. En ciertas modalidades una enfermedad o afección pulmonar es enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Se proporcionan en la presente métodos para el tratamiento de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene fibrosis, en donde el sujeto tiene al menos otra enfermedad o afección. También se proporcionan en la presente métodos para el tratamiento de un sujeto identificado como que tiene o se sospecha que tiene fibrosis, en donde el sujeto tiene al menos otra enfermedad o afección. En ciertas modalidades, tales métodos comprenden administrar a un sujeto un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobase que es complementaria a un miARN o un precursor del mismo. En ciertas modalidades, el miARN es miR-21. En ciertas modalidades otra enfermedad o afección es hipertensión pulmonar. En ciertas modalidades otra enfermedad o afección es una enfermedad relacionada con los vasos sanguíneos. En ciertas de tales modalidades una enfermedad relacionada con los vasos sanguíneos es rigidez arterial, esclerosis de la media (de Mönckeberg), o arterioesclerosis. En ciertas modalidades otra enfermedad o afección es esclerosis por gota. En ciertas modalidades otra enfermedad o afección es esclerosis sistémica. En ciertas modalidades otra enfermedad o afección es fibrosis retroperitoneal, fibrosis proliferativa, fibrosis neoplástica, fibrosis sistémica nefrogénica, fibrosis por inyección, fibrosis mediastínica, mielofibrosis, síndrome de dolor posterior a la vasectomía, o artritis reumatoide.

Se proporcionan en la presente métodos para tratar a un sujeto que tiene un trastorno fibroproliferativo. En ciertas modalidades tales métodos comprenden administrar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno fibroproliferativo un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobase que es complementaria a un miARN o un precursor del mismo. En ciertas modalidades, el miARN es miR-21.

La invención adicionalmente se refiere a tratamientos basados en miARN-21 para cáncer que involucran direccionado específico de cánceres por modulación de señalización ERK mediada por SPRY-1 en células de cáncer. Es bien conocido que miR-21 se sobreexpresa en muchos tipos de cáncer diferentes incluyendo del esófago, adenocarcinoma del colon, cáncer de mama, gliomas, glioblastomas, cáncer de ovarios, cáncer hepatocelular, cáncer de cabeza y cuello, leucemia linfocítica crónica, cáncer pancreático, por nombrar solo algunos de estos.

Por lo tanto, la invención también se refiere al diagnóstico, prevención y/o terapia de los tipos de cáncer arriba mencionados. Todas las características mencionadas en las reivindicaciones pueden combinarse con la descripción de estos tipos de cáncer.

Ciertas Vías de Administración

En ciertas modalidades, administrar a un sujeto comprende administración parenteral. En ciertas modalidades, administrar a un sujeto comprende administración intravenosa. En ciertas modalidades, administrar a un sujeto comprende administración subcutánea.

En ciertas modalidades, administrar a un sujeto comprende administración intraarterial. En ciertas modalidades, administrar a un sujeto comprende administración intracardial. Medios apropiados para administración intracardial incluyen el uso de un catéter, o administración durante cirugía a corazón abierto.

En ciertas modalidades, administración incluye administración pulmonar. En ciertas modalidades, administración pulmonar comprende suministro de oligonucleótido en aerosol al pulmón de un sujeto por inhalación. Después de la inhalación por un sujeto de oligonucleótido en aerosol, el oligonucleótido se distribuye a las células de tejido de pulmón tanto normal como inflamado, incluyendo macrófagos alveolares, eosinófilos, epitelio, endotelio de vasos sanguíneos, y epitelio bronqueolar. Un aparato apropiado para el suministro de una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido modificado incluye, pero no se limita a, un aparato nebulizador estándar. Las formulaciones y métodos para modular el tamaño de las gotas usando aparatos nebulizadores para dirigir porciones específicas del tracto respiratorio y pulmones son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Los aparatos apropiados adicionales incluyen inhaladores de polvo seco o inhaladores de dosis medida.

En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas se administran para alcanzar exposiciones locales en vez de sistémicas. Por ejemplo, la administración pulmonar suministra una composición farmacéutica al pulmón, con exposición sistémica mínima.

5 Las vías de administración apropiadas adicionales incluyen, pero no se limitan a, oral, transmucosal, intestinal, enteral, tópica, supositorio, intratecal, intraventricular, intraperitoneal, intranasal, intraocular, intramuscular, intramedular, e intratumoral.

Ciertos Resultados Clínicos

En ciertas modalidades, los métodos en la presente proporcionan un resultado clínicamente deseable a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene fibrosis.

10 En ciertas modalidades, un resultado clínicamente deseable es la mejora del incremento del peso del corazón. En ciertas de tales modalidades, un resultado clínicamente deseable es la mejora de dilatación ventricular izquierda. En ciertas modalidades un resultado clínicamente deseable es la mejora de acortamiento fraccionado disfuncional. En ciertas modalidades un resultado clínicamente deseable es la prevención del incremento del peso del corazón. En ciertas de tales modalidades, un resultado clínicamente deseable es la prevención de dilatación ventricular izquierda. En ciertas modalidades un resultado clínicamente deseable es la prevención de acortamiento fraccionado disfuncional.

15 En ciertas modalidades un resultado clínicamente deseable es función cardíaca mejorada.

En ciertas modalidades un resultado clínicamente deseable es la mejora de fibrosis. En ciertas modalidades un resultado clínicamente deseable es el aletargado del progreso adicional de la fibrosis. En ciertas modalidades un resultado clínicamente deseable es la detención del progreso adicional de la fibrosis. En ciertas modalidades un resultado clínicamente deseable es una reducción en fibrosis. En ciertas modalidades un resultado clínicamente deseable es una reducción en contenido de colágeno.

20 En ciertas modalidades un resultado terapéuticamente deseable es la función hepática mejorada. La función hepática puede evaluarse por pruebas de función hepática, que miden, entre otros, niveles sanguíneos de transaminasas hepáticas. En ciertas modalidades, un sujeto que tiene función hepática anormal tiene transaminasas hepáticas sanguíneas elevadas. Las transaminasas hepáticas sanguíneas incluyen alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST). En ciertas modalidades, un sujeto que tiene función hepática anormal tiene bilirrubina sanguínea elevada. En ciertas modalidades, un sujeto tiene niveles de albúmina en sangre anormales. En ciertas modalidades, los métodos proporcionados en la presente alteran los niveles de ALT, AST, bilirrubina y/o albúmina en la sangre de tal manera que uno o más de estos niveles está más cercano a los límites normales.

25 En ciertas modalidades, la función hepática de un sujeto se evalúa por el sistema de clasificación Child-Pugh, que define tres clases de función hepática. En este sistema de clasificación, los puntos se asignan para mediciones en una de cinco categorías: niveles de bilirrubina, niveles de albúmina, tiempo de protrombina, ascitos, y encefalopatía. Un punto se asigna por cada una de las siguientes características presentes: bilirrubina sanguínea de menos de 2.0 mg/dl; albúmina en la sangre de más de 3.5 mg/dl; un tiempo de protrombina de menos de 1.7 relación normalizada internacional (INR, por sus siglas en inglés); ascitos están ausentes; o encefalopatía está ausente. Se asignan dos puntos por cada una de las siguientes características presentes: bilirrubina sanguínea de 2-3 mg/dl; bilirrubina sanguínea de 3.5 hasta 2.8 mg/dl; tiempo de protrombina de 1.7-2.3 INR; ascitos es leve a moderado; o encefalopatía es leve. Se asignan tres puntos por cada una de las siguientes características presentes: bilirrubina de más de 3.0 mg/dl; albúmina en la sangre de menos de 2.8 mg/dl; tiempo de protrombina de más de 2.3 INR; ascitos es grave a refractario; o encefalopatía es grave. Los marcadores se agregan y se asigna la Clase A para un marcador de 5-6 puntos, Clase B se asigna para un marcador de 7-9 puntos, y Clase C se asigna para un marcador de 10-15 puntos. En ciertas modalidades, los métodos proporcionados en la presente resultan en una mejora en la función hepática como se mide por el sistema de clasificación Child-Pugh.

Ciertos Fenotipos Celulares

Se proporcionan en la presente métodos para inhibir proliferación celular de fibroblastos. También se proporcionan en la presente métodos para estimular apoptosis en una célula de fibroblasto. Además se proporcionan en la presente métodos para incrementar la proteína Sprouty 1 en una célula de fibroblasto. En ciertas modalidades, tales métodos comprenden poner en contacto un fibroblasto con un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y que tiene una secuencia de nucleobase que es complementaria a un miARN o un precursor del mismo. En ciertas modalidades, el miARN es miR-21.

50 En ciertas modalidades, la célula de fibroblasto está *in vitro*. En ciertas modalidades, la célula de fibroblasto está *in vivo*. En ciertas modalidades, poner en contacto ocurre *in vitro*. En ciertas modalidades, poner en contacto ocurre *in vivo*. En ciertas modalidades, poner en contacto ocurre *ex vivo*.

Ciertas Terapias Adicionales

Los tratamientos para fibrosis pueden comprender más de una terapia. Como tal, en ciertas modalidades proporcionadas en la presente hay métodos para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene fibrosis que comprende administrar al menos una terapia además de administrar un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobase

complementaria a un miARN o un precursor del mismo.

En ciertas modalidades, los métodos proporcionados en la presente comprenden administrar uno o más agentes farmacéuticos adicionales. En ciertas modalidades, los agentes farmacéuticos adicionales incluyen, pero no se limitan a, diuréticos (por ejemplo esprionolactona, eplerenona, furosemida), inotropos (por ejemplo dobutamina, milrinona), digoxin, vasodilatadores, inhibidores de la enzima que convierte la angiotensina II (ACE) (por ejemplo son captopril, enalapril, lisinopril, benazepril, quinapril, fosinopril, y ramipril), bloqueadores del receptor de angiotensina II (ARB) (por ejemplo candesartan, irbesartan, olmesartan, losartan, valsartan, telmisartan, eprosartan), bloqueadores del canal de calcio, dinitrato de isosorbide, hidralazina, nitratos (por ejemplo mononitrato de isosorbide, dinitrato de isosorbide), hidralazina, bloqueadores beta (por ejemplo carvedilol, metoprolol), y péptidos natriuréticos (por ejemplo nesiritida).

En ciertas modalidades, una terapia adicional puede ser un agente farmacéutico que mejora el sistema inmunitario del cuerpo, incluyendo ciclofosfamida de dosis baja, timoestimulina, vitaminas y suplementos nutricionales (por ejemplo, antioxidantes, incluyendo vitaminas A, C, E, beta-caroteno, zinc, selenio, glutathiona, coenzima Q-10 y equinacea), y vacunas, por ejemplo, el complejo inmunoestimulante (ISCOM), que comprende una formulación de vacuna que combina una presentación multimérica de antígeno y un adyuvante.

En ciertas de tales modalidades, la terapia adicional se selecciona para tratar o mejorar el efecto secundario de una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención. Tales efectos secundarios incluyen, sin limitación, reacciones del sitio de inyección, anormalidades de prueba de función hepática, anormalidades de función renal, toxicidad hepática, toxicidad renal, anormalidades del sistema nervioso central, y miopatías. Por ejemplo, niveles de aminotransferasa incrementados en suero pueden indicar toxicidad hepática o anormalidad de función hepática. Por ejemplo, la bilirrubina incrementada puede indicar toxicidad hepática o anormalidad de función hepática.

En ciertas modalidades, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más de otros agentes farmacéuticos se administran al mismo tiempo. En ciertas modalidades, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más de otros agentes farmacéuticos se administran en momentos diferentes. En ciertas modalidades, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más de otros agentes farmacéuticos se preparan en conjunto en una formulación única. En ciertas modalidades, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más de otros agentes farmacéuticos se preparan de forma separada.

Ciertas Composiciones Farmacéuticas

En ciertas modalidades, un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado complementario a un miARN, o precursor del mismo, descrito en la presente se prepara como una composición farmacéutica para el tratamiento de fibrosis. En ciertas modalidades, un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobase complementaria a un miARN o un precursor del mismo se prepara como una composición farmacéutica para la prevención de fibrosis.

En ciertas modalidades, una composición farmacéutica de la presente invención se administra en la forma de una unidad de dosificación (por ejemplo, comprimido, cápsula, bolo, etc.). En ciertas modalidades, tales composiciones farmacéuticas comprenden un oligonucleótido modificado en una dosis seleccionada desde 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 55 mg, 60 mg, 65 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 85 mg, 90 mg, 95 mg, 100 mg, 105 mg, 110 mg, 115 mg, 120 mg, 125 mg, 130 mg, 135 mg, 140 mg, 145 mg, 150 mg, 155 mg, 160 mg, 165 mg, 170 mg, 175 mg, 180 mg, 185 mg, 190 mg, 195 mg, 200 mg, 205 mg, 210 mg, 215 mg, 220 mg, 225 mg, 230 mg, 235 mg, 240 mg, 245 mg, 250 mg, 255 mg, 260 mg, 265 mg, 270 mg, 270 mg, 280 mg, 285 mg, 290 mg, 295 mg, 300 mg, 305 mg, 310 mg, 315 mg, 320 mg, 325 mg, 330 mg, 335 mg, 340 mg, 345 mg, 350 mg, 355 mg, 360 mg, 365 mg, 370 mg, 375 mg, 380 mg, 385 mg, 390 mg, 395 mg, 400 mg, 405 mg, 410 mg, 415 mg, 420 mg, 425 mg, 430 mg, 435 mg, 440 mg, 445 mg, 450 mg, 455 mg, 460 mg, 465 mg, 470 mg, 475 mg, 480 mg, 485 mg, 490 mg, 495 mg, 500 mg, 505 mg, 510 mg, 515 mg, 520 mg, 525 mg, 530 mg, 535 mg, 540 mg, 545 mg, 550 mg, 555 mg, 560 mg, 565 mg, 570 mg, 575 mg, 580 mg, 585 mg, 590 mg, 595 mg, 600 mg, 605 mg, 610 mg, 615 mg, 620 mg, 625 mg, 630 mg, 635 mg, 640 mg, 645 mg, 650 mg, 655 mg, 660 mg, 665 mg, 670 mg, 675 mg, 680 mg, 685 mg, 690 mg, 695 mg, 700 mg, 705 mg, 710 mg, 715 mg, 720 mg, 725 mg, 730 mg, 735 mg, 740 mg, 745 mg, 750 mg, 755 mg, 760 mg, 765 mg, 770 mg, 775 mg, 780 mg, 785 mg, 790 mg, 795 mg, y 800 mg. En ciertas de tales modalidades, una composición farmacéutica de la presente invención comprende una dosis de oligonucleótido modificado seleccionado desde 25 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, y 800 mg.

En ciertas modalidades, un agente farmacéutico es oligonucleótido modificado liofilizado estéril que se reconstituye con un diluyente apropiado por ejemplo, agua estéril para inyección o solución salina estéril para inyección. El producto reconstituido se administra como una inyección subcutánea o como una infusión intravenosa después de la dilución en solución salina. El producto de fármaco liofilizado consiste en un oligonucleótido modificado que se ha preparado en agua para inyección, o en solución salina para inyección, ajustado hasta pH 7.0-9.0 con ácido o base durante la preparación, y luego liofilizado. El oligonucleótido modificado liofilizado puede ser de 25-800 mg de un oligonucleótido modificado. Se entiende que esto abarca 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, y 800 mg de oligonucleótido liofilizado modificado. El producto de fármaco liofilizado puede empacarse en un vial de vidrio transparente, de Tipo I de 2 mL (tratado con sulfato de amonio), tapado con una tapa de hule de bromobutilo y sellado con un sobresello FLIP-

OFF® de aluminio.

En ciertas modalidades, las composiciones de la presente invención pueden contener adicionalmente otros componentes complementarios encontrados convencionalmente en composiciones farmacéuticas, en sus niveles de utilización establecidos en la técnica. De esta manera, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos, adicionales, compatibles tales como, por ejemplo, agentes antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles para formular físicamente varias formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tales como tintes, agentes saborizantes, conservadores, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizadores. Sin embargo, tales materiales, cuando se agregan, no deberán interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsificantes, sales para influenciar la presión osmótica, soluciones amortiguadoras, colorantes, saborizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no interactúan perjudicialmente con los oligonucleótidos de la formulación.

En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden uno o más oligonucleótidos modificados y uno o más excipientes. En ciertas de tales modalidades, los excipientes se seleccionan de agua, soluciones salinas, alcohol, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilasa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona.

En ciertas modalidades, una composición farmacéutica de la presente invención se prepara usando técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a procesos de mezclado, disolución, granulado, elaboración de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapado o formación de comprimidos.

En ciertas modalidades, una composición farmacéutica de la presente invención es un líquido (por ejemplo, una suspensión, elixir y/o solución). En ciertas de tales modalidades, una composición farmacéutica líquida se prepara usando ingredientes conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, conservantes, y agentes colorantes.

En ciertas modalidades, una composición farmacéutica de la presente invención es un sólido (por ejemplo, un polvo, comprimido, y/o cápsula). En ciertas de tales modalidades, una composición farmacéutica sólida que comprende uno o más oligonucleótidos se prepara usando ingredientes conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, almidones, azúcares, diluyentes, agentes granulantes, lubricantes, aglutinantes, y agentes desintegrantes.

En ciertas modalidades, una composición farmacéutica de la presente invención se formula como una preparación de depósito. Ciertas de tales preparaciones de depósito típicamente son de acción más larga que las preparaciones de no depósito. En ciertas modalidades, tales preparaciones se administran por implante (por ejemplo subcutáneamente o intramuscularmente) o por inyección intramuscular. En ciertas modalidades, las preparaciones de depósito se preparan usando materiales poliméricos o hidrofóbicos apropiados (por ejemplo una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio de iones, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

En ciertas modalidades, una composición farmacéutica de la presente invención comprende un sistema de suministro. Los ejemplos de sistemas de suministro incluyen, pero no se limitan a, liposomas y emulsiones. Ciertos sistemas de suministro son útiles para preparar ciertas composiciones farmacéuticas incluyendo aquellas que comprenden compuestos hidrofóbicos. En ciertas modalidades, se usan ciertos solventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido.

En ciertas modalidades, una composición farmacéutica de la presente invención comprende una o más moléculas de suministro específico al tejido diseñadas para suministrar los uno o más agentes farmacéuticos de la presente invención a tejidos o tipos de células específicos. Por ejemplo, en ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas incluyen liposomas cubiertos con un anticuerpo específico de tejido.

En ciertas modalidades, una composición farmacéutica de la presente invención comprende un sistema cosolvente. Ciertos de tales sistemas cosolventes comprenden, por ejemplo, alcohol bencílico, un tensioactivo no polar, un polímero orgánico miscible en agua, y una fase acuosa. En ciertas modalidades, tales sistemas cosolventes se usan para compuestos hidrofóbicos. Un ejemplo no limitante de tal sistema cosolvente es el sistema cosolvente VPD, que es una solución de etanol absoluto que comprende 3% p/v de alcohol bencílico, 8% p/v del tensioactivo no polar Polysorbate 80™ y 65% p/v de polietilenglicol 300. Las proporciones de tales sistemas cosolventes pueden variar considerablemente sin alterar significativamente su solubilidad y sus características de toxicidad. Adicionalmente, la identidad de los componentes cosolventes puede variar: por ejemplo, otros tensioactivos pueden usarse en lugar de Polysorbate 80™; el tamaño de fracción de polietilenglicol puede variar; otros polímeros biocompatibles pueden reemplazar el polietilenglicol, por ejemplo, polivinil pirrolidona; y otros azúcares o polisacáridos pueden sustituirse por dextrosa.

En ciertas modalidades, una composición farmacéutica de la presente invención comprende un sistema de liberación sostenida. Un ejemplo no limitante de tal sistema de liberación sostenida es una matriz semipermeable de polímeros hidrofóbicos sólidos. En ciertas modalidades, los sistemas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar agentes farmacéuticos durante un periodo de horas, días, semanas o meses.

En ciertas modalidades, una composición farmacéutica de la presente invención es preparada para administración oral. En ciertas de tales modalidades, una composición farmacéutica es formulada al combinar uno o más compuestos que

comprenden un oligonucleótido modificado con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Ciertos de tales portadores permiten que se formulen composiciones farmacéuticas como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, mezclas espesas, suspensiones y similares, para ingestión oral por un sujeto. En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas para uso oral se obtienen al mezclar oligonucleótido y uno o más excipientes sólidos. Los excipientes apropiados incluyen, pero no se limitan a, rellenos, tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de papa, gelatina, goma de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa de sodio, y/o polivinilpirrolidona (PVP). En ciertas modalidades, tal mezcla es opcionalmente molida y se agregan opcionalmente auxiliares. En ciertas modalidades, se forman composiciones farmacéuticas para obtener comprimidos o núcleos de grageas. En ciertas modalidades, los agentes desintegrantes (por ejemplo, polivinil pirrolidona reticulada, agar, o ácido alginico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio) se agregan.

En ciertas modalidades, se proporcionan núcleos de grageas con recubrimientos. En ciertas de tales modalidades, pueden usarse soluciones de azúcar concentrada, que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinil pirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, soluciones de laca, y solventes orgánicos apropiados o mezclas de solventes. Pueden agregarse pigmentos o tinturas a los comprimidos o recubrimientos de grageas.

En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas para administración oral son cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina. Ciertas de tales cápsulas de ajuste a presión comprenden uno o más agentes farmacéuticos de la presente invención en mezcla con uno o más rellenos tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas para administración oral son cápsulas selladas, suaves, hechas de gelatina y un plastificante, tales como glicerol o sorbitol. En ciertas cápsulas suaves, uno o más agentes farmacéuticos de la presente invención se disuelven o suspenden en líquidos apropiados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden agregarse estabilizantes.

En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas se preparan para administración bucal. Ciertas de tales composiciones farmacéuticas son comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

En ciertas modalidades, una composición farmacéutica se prepara para administración por inyección (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.). En ciertas de tales modalidades, una composición farmacéutica comprende un portador y se formula en solución acuosa, tal como agua o soluciones amortiguadoras fisiológicamente compatibles tales como solución de Hanks, solución de Ringer, o solución amortiguadora salina fisiológica. En ciertas modalidades, se incluyen otros ingredientes (por ejemplo, ingredientes que ayudan en la solubilidad o sirven como conservantes). En ciertas modalidades, se preparan suspensiones inyectables usando portadores líquidos apropiados, agentes de suspensión y similares. Ciertas composiciones farmacéuticas para inyección se presentan en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o recipientes de dosis múltiples. Ciertas composiciones farmacéuticas para inyección son suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Ciertos solventes apropiados para uso en composiciones farmacéuticas para inyección incluyen, pero no se limitan a, solventes lipofílicos y aceites grasos, tales como aceite de sésamo, ésteres de ácido graso sintético, tales como oleato de etilo o triglicéridos, y liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa de sodio, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, tales suspensiones también pueden contener estabilizantes o agentes apropiados que incrementan la solubilidad de los agentes farmacéuticos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

En ciertas modalidades, una composición farmacéutica se prepara para administración transmucosal. En ciertas de tales modalidades se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que va a permearse. Tales penetrantes generalmente se conocen en la técnica.

En ciertas modalidades, una composición farmacéutica se prepara para administración por inhalación. Ciertas de tales composiciones farmacéuticas para inhalación se preparan en la forma de un rocío en aerosol en un paquete presurizado o un nebulizador. Ciertas de tales composiciones farmacéuticas comprenden un propelente, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas apropiado. En ciertas modalidades que usan un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse con una válvula que suministra una cantidad medida. En ciertas modalidades, pueden formularse cápsulas y cartuchos para uso en un inhalador o insuflador. Ciertas de tales formulaciones comprenden una mezcla en polvo de un agente farmacéutico de la invención y una base en polvo apropiada tal como lactosa o almidón.

En ciertas modalidades, una composición farmacéutica se prepara para administración rectal, tal como un supositorio o enema de retención. Ciertas de tales composiciones farmacéuticas comprenden ingredientes conocidos, tales como manteca de cacao y/o otros glicéridos.

En ciertas modalidades, una composición farmacéutica se prepara para administración tópica. Ciertas de tales composiciones farmacéuticas comprenden bases humectantes blandas, tales como ungüentos o cremas. Las bases de ungüentos apropiadas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, petrolato, petrolato más siliconas volátiles, y lanolina y agua en emulsiones aceitosas. Las bases para crema apropiadas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, crema facial y ungüento hidrofílico.

5 En ciertas modalidades, una composición farmacéutica de la presente invención comprende un oligonucleótido modificado en una cantidad terapéuticamente efectiva. En ciertas modalidades, la cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para prevenir, aliviar, o mejorar los síntomas de una enfermedad o para prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando. La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está bien dentro de la capacidad de aquellos expertos en la técnica.

10 En ciertas modalidades, uno o más oligonucleótidos modificados de la presente invención se formulan como un profármaco. En ciertas modalidades, tras la administración *in vivo*, un profármaco se convierte químicamente en la forma biológicamente, farmacéuticamente o terapéuticamente más activa de un oligonucleótido modificado. En ciertas modalidades, los profármacos son útiles debido a que son más fáciles de administrar que la forma activa correspondiente. Por ejemplo, en ciertos casos, un profármaco puede estar más biodisponible (por ejemplo, a través de administración oral) que la forma activa correspondiente. En ciertos casos, un profármaco puede tener solubilidad mejorada comparada con la forma activa correspondiente. En ciertas modalidades, los profármacos son menos solubles en agua que la forma activa correspondiente. En ciertos casos, tales profármacos poseen transmisión superior a través de las membranas celulares, donde la solubilidad en agua es perjudicial para la movilidad. En ciertas modalidades, un profármaco es un éster. En ciertas de tales modalidades, el éster es hidrolizado metabólicamente a ácido carboxílico tras la administración. En ciertos casos el ácido carboxílico que contiene el compuesto es la forma activa correspondiente. En ciertas modalidades, un profármaco comprende un péptido corto (polioaminoácido) unido a un grupo ácido. En ciertas de tales modalidades, el péptido se desdobra tras la administración para formar la forma activa correspondiente.

20 En ciertas modalidades, un profármaco se produce al modificar un compuesto farmacéuticamente activo de tal manera que el compuesto activo se regenerará después de la administración *in vivo*. El profármaco puede diseñarse para alterar la estabilidad metabólica o las características de transporte de un fármaco, para enmascarar los efectos secundarios o toxicidad, para mejorar el sabor de un fármaco o para alterar otras características o propiedades de un fármaco. En virtud del conocimiento de los procesos farmacodinámicos y el metabolismo del fármaco *in vivo*, aquellos de experiencia en esta técnica, una vez que se conoce un compuesto farmacéuticamente activo, pueden diseñar los profármacos del compuesto (ver, por ejemplo, Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, New York, páginas 388-392).

Ciertos Compuestos

30 En ciertas modalidades, los métodos proporcionados en la presente invención comprenden la administración de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado. En ciertas modalidades, el compuesto consiste en un oligonucleótido modificado.

35 En ciertas de tales modalidades, un compuesto comprende un oligonucleótido modificado hibridado a una hebra de complementariedad, es decir un compuesto comprende un compuesto oligomérico de hebra doble. En ciertas modalidades, la hibridación de un oligonucleótido modificado a una hebra de complementariedad forma al menos un extremo de punta roma. En ciertas de tales modalidades, la hibridación de un oligonucleótido modificado a una hebra de complementariedad forma un extremo de punta roma en cada extremo del compuesto oligomérico de hebra doble. En ciertas modalidades, un extremo de un oligonucleótido modificado comprende uno o más nucleósidos ligados adicionales con relación al número de nucleósidos ligados de la hebra de complementariedad. En ciertas modalidades, los uno o más nucleósidos adicionales están en el extremo 5' de un oligonucleótido modificado. En ciertas modalidades, los uno o más nucleósidos adicionales están en el extremo 3' de un oligonucleótido modificado. En ciertas modalidades, al menos una nucleobase de un nucleósido de los uno o más nucleósidos adicionales es complementaria al ARN objetivo. En ciertas modalidades, cada nucleobase de cada uno o más nucleósidos adicionales es complementaria al ARN objetivo. En ciertas modalidades, un extremo de la hebra de complementariedad comprende uno o más nucleósidos adicionales ligados con relación al número de nucleósidos ligados de un oligonucleótido modificado. En ciertas modalidades, los uno o más nucleósidos adicionales ligados están en el extremo 3' de la hebra de complementariedad. En ciertas modalidades, los uno o más nucleósidos adicionales ligados están en el extremo 5' de la hebra de complementariedad. En ciertas modalidades, dos nucleósidos adicionales ligados están ligados a un extremo. En ciertas modalidades, un nucleósido adicional está ligado a un extremo.

50 En ciertas modalidades, un compuesto comprende un oligonucleótido modificado conjugado a una o más porciones que aumentan la actividad, distribución celular o absorción celular de los oligonucleótidos antisentido resultantes. En ciertas de tales modalidades, la porción es una porción de colesterol o una porción de lípido. Las porciones adicionales para conjugar incluyen carbohidratos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, coumarinas, y pigmentos. En ciertas modalidades, un grupo conjugado se enlaza directamente a un oligonucleótido modificado. En ciertas modalidades, un grupo conjugado es enlazado a un oligonucleótido modificado por una porción de ligadura seleccionada de amino, hidroxilo, ácido carboxílico, tiol, insaturaciones (por ejemplo, enlaces dobles o triples), ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (ADO), 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), ácido 6-aminohexanoico (AHX o AHA), alquilo C₁-C₁₀ sustituido, alquenilo C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido, y alquinilo C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido. En ciertas de tales modalidades, el grupo sustituyente se selecciona de hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenilo, nitro, tiol, tioalcoxi, halógeno, alquilo, arilo, alquenilo y alquinilo.

60 En ciertas de tales modalidades, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado que tiene uno o más grupos estabilizantes que están enlazados a uno o ambos extremos de un oligonucleótido modificado para aumentar las

propiedades tales como, por ejemplo, estabilidad de nucleasa. Incluidas en grupos estabilizantes están las estructuras de tapa. Estas modificaciones de los extremos protegen un oligonucleótido modificado de la degradación de exonucleasa, y pueden ayudar en el suministro y/o localización dentro de una célula. La tapa puede estar presente en el extremo 5' (tapa 5'), o en el extremo 3' (tapa 3'), o puede estar presente en ambos extremos. Las estructuras de tapa incluyen, por ejemplo, tapas desoxi abásicas invertidas.

Las estructuras de tapa apropiadas incluyen un nucleótido de 4',5'-metileno, un nucleótido 1-(beta-D-eritrofuranosilo), un nucleótido 4'-tio, un nucleótido carbocíclico, un nucleótido 1,5-anhidrohexitol, un L-nucleótido, un alfa-nucleótido, un nucleótido base modificado, una ligadura fosforoditioato, un nucleótido treo-pentofuranosilo, un nucleótido acíclico 3',4'-seco, un nucleótido acíclico 3,4-dihidroxitil, un nucleótido acíclico 3,5-dihidroxitil, una porción 3'-3'-invertida de nucleótido, una porción 3'-3'-invertida abásica, una porción 3'-2'-invertida de nucleótido, una porción 3'-2'-invertida abásica, un 1,4-butanediol fosfato, un 3'-fosforamidato, un hexilfosfato, un aminohexil fosfato, un 3'-fosforotioato, un fosforoditioato, una porción metilfosfonato ponteada, y una porción metilfosfonato no ponteada 5'-amino-alkil fosfato, un 1,3-diamino-2-propil fosfato, 3-aminopropil fosfato, un 6-aminohexil fosfato, un 1,2-aminododecil fosfato, un hidroxipropil fosfato, una porción 5'-5'-invertida de nucleótido, una porción 5'-5'-invertida abásica, un 5'-fosforamidato, un 5'-fosforotioato, un 5'-amino, un 5'-fosforamidato ponteado y/o no ponteado, un fosforotioato, y una porción 5'-mercapto.

Ciertas Secuencias de Nucleobases

Se proporcionan en la presente métodos para el tratamiento o prevención de fibrosis. En ciertas modalidades, los métodos comprenden administración de una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido modificado. En ciertas modalidades, los métodos comprenden administración de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia que es complementaria a un miARN o un precursor del mismo. En ciertas modalidades, el miARN es miR-21.

Las secuencias de nucleobases de miARN maduros y sus secuencias de bucle madre correspondientes descritas en la presente son las secuencias encontradas en miRBase, una base de datos para buscar en línea secuencias y anotaciones de miARN, que se encuentra en <http://microrna.sanger.ac.uk/>. Las entradas en la base de datos de secuencia miRBase representan una porción de horquilla predicha de un transcripto de miARN (el bucle madre), con información en la ubicación y secuencia de la secuencia de miARN madura. Las secuencias de bucle madre de miARN en la base de datos no son estrictamente precursores miARN (pre-miARN), y pueden en algunos casos incluir el pre-miARN y alguna secuencia de flanqueo del transcripto primario presupuesto. Las secuencias de nucleobase de miARN descritas en la presente abarcan cualquier versión del miARN, incluyendo las secuencias descritas en Release 10.0 de la base de datos de secuencia miRBase y secuencias descritas en cualquier entrega previa de la base de datos de secuencia miRBase. Una liberación de la base de datos de secuencia puede resultar en el renombramiento de ciertos miARN. Una liberación de la base de datos de la secuencia puede resultar en una variación de la secuencia de miARN madura. Los compuestos de la presente invención abarcan oligonucleótidos modificados que son complementarios a cualquier versión de secuencia de nucleobase de los miARN descritos en la presente.

Se entiende que cualquier secuencia de nucleobase establecida en la presente es independiente de cualquier modificación a una porción de azúcar, una ligadura internucleósido, o una nucleobase. Además se entiende que una secuencia de nucleobase que comprende U también abarca la misma secuencia de nucleobase en donde 'U' se reemplaza por 'T' en una o más posiciones que tienen 'U.' En cambio, se entiende que una secuencia de nucleobase que comprende T también abarca la misma secuencia de nucleobase en donde 'T' se reemplaza por 'U' en una o más posiciones que tienen 'T.'

En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase que es complementaria a un miARN o un precursor del mismo, lo que significa que la secuencia de nucleobase de un oligonucleótido modificado es al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idéntica al complemento de un miARN o precursor del mismo sobre una región de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más nucleobases, o que las dos secuencias hibridan en condiciones de hibridación severas. En consecuencia, en ciertas modalidades la secuencia de nucleobase de un oligonucleótido modificado puede tener uno o más pares base en alineación errónea con respecto a su miARN objetivo o secuencia precursora de miARN objetivo, y es capaz de hibridar a su secuencia objetivo. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase que es 100% complementaria a un miARN o un precursor del mismo. En ciertas modalidades, la secuencia de nucleobase de un oligonucleótido modificado tiene complementariedad de longitud completa con respecto a un miARN.

En ciertas modalidades, un miR-21 tiene la secuencia de nucleobase 5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3' (SEQ ID NO: 1). En ciertas modalidades una secuencia de bucle madre miR-21 tiene la secuencia de nucleobase 5'-UGUCGGUAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUGAAUCUCAUGGCAACACCAGUCGAUGGGCUGUCUGACA-3' (SEQ ID NO: 11).

En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia que es complementaria a la secuencia de nucleobase de miR-21 establecida como SEQ ID NO: 1.

En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia es complementaria a la secuencia de nucleobase de una secuencia de bucle madre de miARN establecida como SEQ ID NO: 11. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase que es complementaria a la región de nucleobases 8-29

de SEQ ID NO: 11. En ciertas modalidades un oligonucleótido modificado tiene una secuencia que es complementaria a la región de nucleobases 46 a 66 de SEQ ID NO: 11.

En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase que comprende la secuencia de nucleobase 5'-UCAACAUCAGUCUGAUAAAGCUA-3' (SEQ ID NO: 12).

5 En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase que consiste en la secuencia de nucleobase establecida como SEQ ID NO: 12.

En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase que es complementaria a una secuencia de nucleobase de una secuencia pri-miR que comprende miR-21.

10 En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase que es complementaria a una secuencia de nucleobase que tiene al menos 80% de identidad con la secuencia de nucleobase establecida en SEQ ID NO: 1. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase que es complementaria a una secuencia de nucleobase que tiene al menos 85%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, o al menos 98% de identidad con la secuencia de nucleobase establecida en SEQ ID NO: 1.

15 En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase que es complementaria a una secuencia de nucleobase que tiene al menos 80% de identidad con una secuencia de nucleobase de una secuencia de bucle madre miR-21 establecida en SEQ ID NO: 11. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase que es complementaria a una secuencia de nucleobase que tiene al menos 85%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, o al menos 98% de identidad con una secuencia de nucleobase de una secuencia de bucle madre miR-21 establecida en SEQ ID NO: 11.

20 En ciertas modalidades, una secuencia de nucleobase de un oligonucleótido modificado tiene propiedad complementaria de longitud completa con respecto a una secuencia de nucleobase miARN enumerada en la presente, o un precursor del mismo. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase que tiene una alineación errónea con respecto a la secuencia de nucleobase del miARN maduro, o un precursor del mismo. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase que tiene dos alineaciones erróneas con respecto a la secuencia de nucleobase del miARN, o un precursor del mismo. En ciertas de tales modalidades, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase que tiene no más de dos alineaciones erróneas con respecto a la secuencia de nucleobase del miARN maduro, o un precursor del mismo. En ciertas de tales modalidades, las nucleobases de alineación errónea están contiguas. En ciertas de tales modalidades, las nucleobases de alineación errónea no están contiguas.

30 En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en un número de nucleósidos ligados que es igual a la longitud del miARN maduro al cual es complementario.

35 En ciertas modalidades, el número de nucleósidos ligados de un oligonucleótido modificado es menor que la longitud del miARN maduro al cual es complementario. En ciertas de tales modalidades, el número de nucleósidos ligados de un oligonucleótido modificado es uno menos que la longitud del miARN maduro al cual es complementario. En ciertas de tales modalidades, un oligonucleótido modificado tiene un nucleósido menos en el extremo 5'. En ciertas de tales modalidades, un oligonucleótido modificado tiene un nucleósido menos en el extremo 3'. En ciertas de tales modalidades, un oligonucleótido modificado tiene dos nucleósidos menos en el extremo 5'. En ciertas de tales modalidades, un oligonucleótido modificado tiene dos nucleósidos menos en el extremo 3'. Un oligonucleótido modificado que tiene un número de nucleósidos ligados que es menor que la longitud del miARN, en donde cada nucleobase de un oligonucleótido modificado es complementario a cada nucleobase en una posición correspondiente en un miARN, es considerado un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobase 100% complementaria a una porción de una secuencia de miARN.

40 En ciertas modalidades, el número de nucleósidos ligados de un oligonucleótido modificado es mayor que la longitud del miARN al cual es complementario. En ciertas de tales modalidades, la nucleobase de un nucleósido adicional es complementaria a una nucleobase de una secuencia de bucle madre de miARN. En ciertas modalidades, el número de nucleósidos ligados de un oligonucleótido modificado es uno mayor que la longitud del miARN al cual es complementario. En ciertas de tales modalidades, el nucleósido adicional está en el extremo 5' de un oligonucleótido modificado. En ciertas de tales modalidades, el nucleósido adicional está en el extremo 3' de un oligonucleótido modificado. En ciertas modalidades, el número de nucleósidos ligados de un oligonucleótido modificado es dos veces mayor que la longitud del miARN al cual es complementario. En ciertas de tales modalidades, los dos nucleósidos adicionales están en el extremo 5' de un oligonucleótido modificado. En ciertas de tales modalidades, los dos nucleósidos adicionales están en el extremo 3' de un oligonucleótido modificado. En ciertas de tales modalidades, un nucleósido adicional se ubica en el extremo 5' y un nucleósido adicional se ubica en el extremo 3' de un oligonucleótido modificado.

55 En ciertas modalidades, una porción de la secuencia de nucleobase de un oligonucleótido modificado es 100% complementaria a la secuencia de nucleobase del miARN, pero el oligonucleótido modificado no es 100% complementario con respecto a su longitud completa. En ciertas de tales modalidades, el número de nucleósidos de un oligonucleótido modificado que tiene una porción 100% complementaria es mayor que la longitud del miARN. Por ejemplo, un oligonucleótido modificado que consiste en 24 nucleósidos ligados, donde las nucleobases de nucleósidos 1 a 23 son cada una complementarias a una posición correspondiente de un miARN que es de 23 nucleobases de

60

longitud, tiene una porción de 23 nucleósidos que es 100% complementaria a la secuencia de nucleobase del miARN y aproximadamente 96% de complementariedad general para la secuencia de nucleobase del miARN.

En ciertas modalidades, la secuencia de nucleobase de un oligonucleótido modificado es 100% complementaria a una porción de la secuencia de nucleobase de un miARN. Por ejemplo, un oligonucleótido modificado que consiste en 22 nucleósidos ligados, donde las nucleobases de nucleósidos 1 a 22 son cada una complementarias a una posición correspondiente de un miARN que es de 23 nucleobases de longitud, es 100% complementaria a una porción de 22 nucleobases de la secuencia de nucleobase de un miARN. Tal oligonucleótido modificado tiene aproximadamente 96% de complementariedad general para la secuencia de nucleobase del miARN completo, y tiene 100% de complementariedad para una porción de 22 nucleobases del miARN.

En ciertas modalidades, una porción de la secuencia de nucleobase de un oligonucleótido modificado es 100% complementaria a una porción de la secuencia de nucleobase de un miARN, o un precursor del mismo. En ciertas de tales modalidades, 15 nucleobases contiguas de un oligonucleótido modificado son cada una complementarias a 15 nucleobases contiguas de un miARN, o un precursor del mismo. En ciertas de tales modalidades, 16 nucleobases contiguas de un oligonucleótido modificado son cada una complementarias a 16 nucleobases contiguas de un miARN, o un precursor del mismo. En ciertas de tales modalidades, 17 nucleobases contiguas de un oligonucleótido modificado son cada una complementarias a 17 nucleobases contiguas de un miARN, o un precursor del mismo. En ciertas de tales modalidades, 18 nucleobases contiguas de un oligonucleótido modificado son cada una complementarias a 18 nucleobases contiguas de un miARN, o un precursor del mismo. En ciertas de tales modalidades, 19 nucleobases contiguas de un oligonucleótido modificado son cada una complementarias a 19 nucleobases contiguas de un miARN, o un precursor del mismo. En ciertas de tales modalidades, 20 nucleobases contiguas de un oligonucleótido modificado son cada una complementarias a 20 nucleobases contiguas de un miARN, o un precursor del mismo. En ciertas de tales modalidades, 22 nucleobases contiguas de un oligonucleótido modificado son cada una complementarias a 22 nucleobases contiguas de un miARN, o un precursor del mismo. En ciertas de tales modalidades, 23 nucleobases contiguas de un oligonucleótido modificado son cada una complementarias a 23 nucleobases contiguas de un miARN, o un precursor del mismo. En ciertas de tales modalidades, 24 nucleobases contiguas de un oligonucleótido modificado son cada una complementarias a 24 nucleobases contiguas de un miARN, o un precursor del mismo.

Ciertos oligonucleótidos modificados

En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en de 12 hasta 30 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en de 15 hasta 25 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en de 19 hasta 24 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en de 21 hasta 24 nucleósidos ligados.

En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en 12 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en 13 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en 14 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en 15 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades un oligonucleótido modificado consiste en 16 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en 17 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en 18 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en 19 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en 20 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en 21 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en 22 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en 23 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en 24 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en 25 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en 26 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en 27 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en 28 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en 29 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado consiste en 30 nucleósidos ligados. En ciertas de tales modalidades, un oligonucleótido modificado comprende nucleósidos ligados seleccionados de nucleobases contiguas de SEQ ID NO: 12.

Ciertas Modificaciones

Los oligonucleótidos modificados de la presente invención comprenden una o más modificaciones para una nucleobase, azúcar, y/o ligadura de internucleósido. Una nucleobase modificada, azúcar, y/o ligadura de internucleósido puede seleccionarse sobre una forma no modificada debido a las propiedades deseadas tales como, por ejemplo, ingesta celular potenciada, afinidad potenciada para otros oligonucleótidos u objetivos de ácido nucleico y estabilidad incrementada en presencia de nucleasas.

En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado de la presente invención comprende uno o más nucleósidos modificados. En ciertas de tales modalidades, un nucleósido modificado es un nucleósido estabilizante. Un ejemplo de un nucleósido estabilizante es un nucleósido modificado con azúcar.

En ciertas modalidades, un nucleósido modificado es un nucleósido modificado con azúcar. En ciertas de tales modalidades, los nucleósidos modificados con azúcar pueden comprender además una porción de base heterocíclica

- modificada o natural y/o una ligadura de internucleósido natural o modificada y pueden incluir modificaciones adicionales independientes de la modificación de azúcar. En ciertas modalidades, un nucleósido modificado con azúcar es un nucleósido modificado en 2', en donde el anillo de azúcar está modificado en el carbono 2' de la ribosa natural o 2'-desoxi-ribosa.
- 5 En ciertas modalidades, un nucleósido modificado en 2' tiene una porción de azúcar bicíclica. En ciertas de tales modalidades, la porción de azúcar bicíclica es un azúcar D en la configuración alfa. En ciertas de tales modalidades, la porción de azúcar bicíclica es un azúcar D en la configuración beta. En ciertas de tales modalidades, la porción de azúcar bicíclica es un azúcar L en la configuración alfa. En ciertas de tales modalidades, la porción de azúcar bicíclica es un azúcar L en la configuración beta.
- 10 En ciertas modalidades, la porción de azúcar bicíclica comprende un grupo de puente entre los átomos de carbono 2' y 4'. En ciertas de tales modalidades, el grupo de puente comprende desde 1 hasta 8 grupos birradicales ligados. En ciertas modalidades, la porción de azúcar bicíclica comprende desde 1 hasta 4 grupos birradicales ligados. En ciertas modalidades la porción de azúcar bicíclica comprende 2 o 3 grupos birradicales ligados. En ciertas modalidades, la porción de azúcar bicíclica comprende 2 grupos birradicales ligados. En ciertas modalidades, un grupo birradical ligado se selecciona de -O-, -S-, -N(R₁)-, -C(R₁)(R₂)-, -C(R₁)=C(R₁)-, -C(R₁)=N-, -C(=NR₁)-, -Si(R₁)(R₂)-, -S(=O)₂-, -S(=O)-, -C(=O)- y -C(=S)-; donde cada R₁ y R₂ son, independientemente, H, hidroxilo, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂; alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, arilo C₅-C₂₀, arilo C₅-C₂₀ sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, radical alicíclico C₅-C₇, radical alicíclico C₅-C₇ sustituido, halógeno, oxi sustituido (-O-), amino, amino sustituido, azido, carboxilo, carboxilo sustituido, acilo, acilo sustituido, CN, tiol, tiol sustituido, sulfonilo (S(=O)₂-H), sulfonilo sustituido, sulfoxilo (S(=O)-H) o sulfoxilo sustituido; y cada grupo sustituyente es, independientemente, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, amino, amino sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C₁-C₁₂, aminoalcoxi C₁-C₁₂ aminoalquilo C₁-C₁₂ sustituido, aminoalcoxi C₁-C₁₂ sustituido o un grupo protector.
- 15 20 25 En algunas modalidades la porción de azúcar bicíclica es puenteada entre los átomos de carbono 2' y 4' con un grupo birradical seleccionado de -O-(CH₂)_p-, -O-CH₂-, -O-CH₂CH₂-, -O-CH(alquilo)-, -NH-(CH₂)_p-, -N(alquilo)-(CH₂)_p-, -O-CH(alquilo)-, -(CH(alquilo))-(CH₂)_p-, -NH-O-(CH₂)_p-, -N(alquilo)-O-(CH₂)_p-, o -O-N(alquilo)-(CH₂)_p-, en donde p es 1, 2, 3, 4 o 5 y cada grupo alquilo puede además sustituirse. En ciertas modalidades, p es 1, 2 o 3.
- 30 En ciertas modalidades, un nucleósido modificado en 2' comprende un grupo 2'-sustituyente seleccionado de halo, alilo, amino, azido, SH, CN, OCN, CF₃, OCF₃, O-, S-, o N(R_m)-alquilo; O-, S-, o N(R_m)-alqueno; O-, S- o N(R_m)-alquino; O-alquilenil-O-alquilo, alquino, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo, O-aralquilo, O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n) o O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), donde cada R_m y R_n son, independientemente, H, un grupo protector amino o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido. Estos grupos 2'-sustituyentes pueden además sustituirse con uno o más grupos sustituyentes independientemente seleccionados de hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenilo, nitro (NO₂), tiol, tioalcoxi (S-alquilo), halógeno, alquilo, arilo, alqueno y alquino.
- 35 En ciertas modalidades, un nucleósido modificado en 2' comprende un grupo 2'-sustituyente seleccionado de F, NH₂, N₃, OCF₃, O-CH₃, O(CH₂)₃NH₂, CH₂-CH=CH₂, O-CH₂-CH=CH₂, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), -O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂, y acetamida sustituida en N (O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n) donde cada R_m y R_n son, independientemente, H, un grupo protector amino o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido.
- 40 En ciertas modalidades, un nucleósido modificado en 2' comprende un grupo 2'-sustituyente seleccionado de F, OCF₃, O-CH₃, OCH₂CH₂OCH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(CH₃)₂, -O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂, y O-CH₂-C(=O)-N(H)CH₃.
- En ciertas modalidades, un nucleósido modificado en 2' comprende un grupo 2'-sustituyente seleccionado de F, O-CH₃, y OCH₂CH₂OCH₃.
- 45 En ciertas modalidades, un nucleósido modificado con azúcar es un nucleósido modificado en 4'-tio. En ciertas modalidades, un nucleósido modificado con azúcar es un nucleósido modificado en 4'-tio-2'. Un nucleósido modificado en 4'-tio tiene un β-D-ribonucleósido donde el 4'-O se reemplaza con 4'-S. Un nucleósido modificado en 4'-tio-2' es un nucleósido modificado en 4'-tio que tiene el 2'-OH reemplazado con un grupo 2'-sustituyente. Los grupos 2'-sustituyentes incluyen 2'-OCH₃, 2'-O-(CH₂)₂-OCH₃, y 2'-F.
- 50 En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado de la presente invención comprende una o más intermodificaciones de nucleósido. En ciertas de tales modalidades, cada ligadura internucleósido de un oligonucleótido modificado es una ligadura internucleósido modificada. En ciertas modalidades, una ligadura internucleósido modificada comprende un átomo de fósforo.
- En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado de la presente invención comprende al menos una ligadura fosforotioato internucleósido. En ciertas modalidades, cada ligadura internucleósido de un oligonucleótido modificado es una ligadura internucleósido de fosforotioato.
- 55 En ciertas modalidades, una ligadura internucleósido modificada no comprende un átomo de fósforo. En ciertas de tales modalidades, una ligadura internucleósido se forma por una ligadura internucleósido alquilo de cadena corta. En ciertas de tales modalidades, una ligadura internucleósido se forma por ligaduras internucleósido cicloalquilo. En ciertas de tales modalidades, una ligadura internucleósido se forma por una ligadura heteroátomo y alquil internucleósido mezclada. En ciertas de tales modalidades, una ligadura internucleósido se forma por ligaduras heteroátomo y cicloalquilo

internucleósido mezcladas. En ciertas de tales modalidades, una ligadura internucleósido se forma por una o más ligaduras internucleósido heteroatómicas de cadena corta. En ciertas de tales modalidades, una ligadura internucleósido se forma por una o más ligaduras internucleósido heterocíclicas. En ciertas de tales modalidades, una ligadura internucleósido tiene una columna amida. En ciertas de tales modalidades, una ligadura internucleósido tiene partes del componente N, O, S y CH₂ mezcladas.

En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende una o más nucleobases modificadas. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende uno o más 5-metilcitosinas. En ciertas modalidades, cada citosina de un oligonucleótido modificado comprende una 5-metilcitosina.

En ciertas modalidades, una nucleobase modificada se selecciona de 5-hidroximetil citosina, 7-deazaguanina Y 7-deazaadenina. En ciertas modalidades, una nucleobase modificada se selecciona de 7-deaza-adenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. En ciertas modalidades, una nucleobase modificada se selecciona de pirimidinas sustituidas en 5, 6-azapirimidinas y N-2, N-6 y purinas sustituidas en O-6, incluyendo 2 aminopropiladenina, 5-propiniluracil y 5-propinilcitosina.

En ciertas modalidades, una nucleobase modificada comprende un heterociclo policíclico. En ciertas modalidades, una nucleobase modificada comprende un heterociclo tricíclico. En ciertas modalidades, una nucleobase modificada comprende un derivado de fenoxazina. En ciertas modalidades, la fenoxazina puede además modificarse para formar una nucleobase conocida en la técnica como abrazadera G.

Ciertos Motivos de Oligonucleótido

Las motivos apropiados para oligonucleótidos modificados de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, completamente modificados, uniformemente modificados, posicionalmente modificados, y gapmero. Los oligonucleótidos modificados que tienen un motivo completamente modificado, incluyendo un motivo uniformemente modificado, pueden diseñarse para dirigirse a miARN maduros. Como alternativa, los oligonucleótidos modificados que tienen un motivo completamente modificado, incluyendo un motivo uniformemente modificado, pueden diseñarse para dirigir ciertos sitios de pri-miARN o pre-miARN, para bloquear el procesamiento de precursores miARN en miARN maduros. Los oligonucleótidos modificados que tienen un motivo completamente modificado o motivo uniformemente modificado son inhibidores efectivos de la actividad miARN.

En ciertas modalidades, el oligonucleótido completamente modificado comprende una modificación de azúcar en cada nucleósido. En ciertas de tales modalidades, las pluralidades de nucleósidos son 2'-O-metoxietilo nucleósidos y los nucleósidos restantes son 2'-fluoro nucleósidos. En ciertas de tales modalidades, cada una de una pluralidad de nucleósidos es un 2'-O-metoxietilo nucleósido y cada una de una pluralidad de nucleósidos es un nucleósido bicíclico. En ciertas de tales modalidades, un oligonucleótido completamente modificado además comprende al menos una ligadura internucleósido modificada. En ciertas de tales modalidades, cada ligadura internucleósido de un oligonucleótido completamente modificado por azúcar es una ligadura internucleósido modificada. En ciertas modalidades, un oligonucleótido completamente modificado por azúcar además comprende al menos una ligadura fosforotioato internucleósido. En ciertas de tales modalidades, cada ligadura internucleósido de un oligonucleótido completamente modificado por azúcar es una ligadura internucleósido de fosforotioato.

En ciertas modalidades, el oligonucleótido completamente modificado se modifica en cada ligadura internucleósido. En ciertas de tales modalidades, cada ligadura internucleósido de un oligonucleótido completamente modificado es una ligadura internucleósido de fosforotioato.

En ciertas modalidades, un oligonucleótido uniformemente modificado comprende la misma modificación de azúcar en cada nucleósido. En ciertas de tales modalidades, cada nucleósido de un oligonucleótido modificado comprende una modificación de azúcar de 2'-O-metoxietilo. En ciertas modalidades, cada nucleósido de un oligonucleótido modificado comprende una modificación de azúcar de 2'-O-metilo. En ciertas modalidades, cada nucleósido de un oligonucleótido modificado comprende una modificación de azúcar de 2'-fluoro. En ciertas de tales modalidades, un oligonucleótido uniformemente modificado además comprende al menos una ligadura internucleósido modificada. En ciertas de tales modalidades, cada ligadura internucleósido de un oligonucleótido uniformemente modificado con azúcar es una ligadura internucleósido modificada. En ciertas modalidades, un oligonucleótido uniformemente modificado con azúcar además comprende al menos una ligadura internucleósido fosforotioato. En ciertas de tales modalidades, cada ligadura internucleósido de un oligonucleótido uniformemente modificado con azúcar es una ligadura internucleósido de fosforotioato.

En ciertas modalidades, un oligonucleótido uniformemente modificado comprende las mismas modificaciones de ligadura de internucleósido en sí mismo. En ciertas de tales modalidades, cada ligadura internucleósido de un oligonucleótido uniformemente modificado es una ligadura internucleósido de fosforotioato.

En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la misma modificación de azúcar en cada nucleósido, y además comprende una o más modificaciones de ligadura de internucleósido. En ciertas de tales modalidades, el oligonucleótido modificado comprende una ligadura de internucleósido modificada en el extremo 5' y una ligadura de internucleósido modificada en el extremo 3'. En ciertas modalidades, el oligonucleótido modificado comprende dos ligaduras internucleósido modificadas en el extremo 5' y dos ligaduras internucleósido modificadas en el extremo 3'. En ciertas modalidades, el oligonucleótido modificado comprende dos ligaduras internucleósido modificadas en el extremo 5' y tres ligaduras internucleósido modificadas en el extremo 3'. En ciertas modalidades, el oligonucleótido modificado comprende dos ligaduras internucleósido modificadas en el extremo 5' y cuatro ligaduras internucleósido modificadas en el extremo 3'. En ciertas de tales modalidades, la ligadura de internucleósido modificada es una ligadura internucleósido

de fosforotioato.

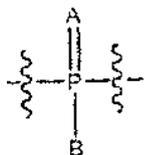
En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado se representa por la siguiente fórmula III:



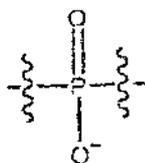
5

En ciertas de tales modalidades, un compuesto se representa por la fórmula III. En ciertas modalidades, Q es un nucleósido modificado por 2'-O-metilo. En ciertas modalidades, x es fosforotioato. En ciertas modalidades, y es fosfodiéster. En ciertas modalidades, cada uno de z^1 , z^2 , z^3 , y z^4 es, independientemente fosforotioato o fosfodiéster. En ciertas modalidades, n es 6 hasta 17. En ciertas modalidades, L es colesterol. En ciertas modalidades, n es 12 hasta 17.

En ciertas modalidades, x es



10 Uno de A y B es S mientras que el otro es O; y es

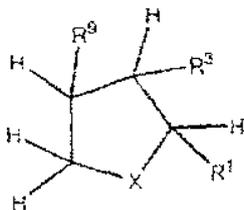


Cada uno de z^1 , z^2 , z^3 , y z^4 es independientemente x o y;

n = 6-17

L es

15



En donde:

X es $N(CO)R^7$, o NR^7 ;

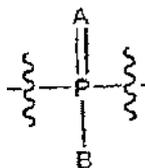
Cada uno de R^1 , R^3 y R^9 , es independientemente, H, OH, o $-CH_2OR^b$ con la condición de que al menos uno de R^1 , R^3 y R^9 sea OH y al menos uno de R^1 , R^3 y R^9 sea $-CH_2OR^b$;

20 R^7 es R^d o alquilo C_1-C_{20} sustituido con NR^cR^d o $NHC(O)R^d$;

R^c es H o alquilo C_1-C_6 ;

R^d es un radical carbohidrato; o un radical esteroide, que se ata opcionalmente a al menos un radical carbohidrato; y

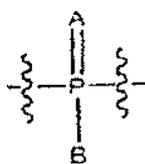
R^b es



con uno de A y B es S mientras que el otro es O.

25

En ciertas modalidades, R^d es colesterol. En ciertas modalidades cada uno de z^1 , z^2 , z^3 , y z^4 es



con uno de A y B es S mientras que el otro es O.

- 5 En ciertas modalidades, R^1 es $-\text{CH}_2\text{OR}^b$. En ciertas modalidades, R^9 es OH. En ciertas modalidades, R^1 y R^9 son *trans*. En ciertas modalidades R^9 es OH. En ciertas modalidades, R^1 y R^3 son *trans*. En ciertas modalidades, R^3 es $-\text{CH}_2\text{OR}^b$. En ciertas modalidades, R^1 es OH. En ciertas modalidades, R^1 y R^3 son *trans*. En ciertas modalidades, R^9 es OH. En ciertas modalidades, R^3 y R^9 son *trans*. En ciertas modalidades, R^9 es CH_2OR^b . En ciertas modalidades, R^1 es OH. En ciertas modalidades, R^1 y R^9 son *trans*. En ciertas modalidades, X es NC(O)R^7 . En ciertas modalidades, R^7 es $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NHC(O)R}^d$.
- 10 En ciertas modalidades, un oligonucleótido posicionalmente modificado comprende regiones de nucleósidos ligados, donde cada nucleósido de cada región comprende la misma porción de azúcar, y donde cada nucleósido de cada región comprende una porción de azúcar diferente de la de una región adyacente.
- 15 En ciertas modalidades, un oligonucleótido posicionalmente modificado comprende al menos 10 nucleósidos modificados en 2'-fluoro. Tal oligonucleótido posicionalmente modificado puede representarse por la siguiente fórmula I: $5'\text{-T}_1\text{-(Nu}_1\text{-L}_1\text{)}_{n_1}\text{-(Nu}_2\text{-L}_2\text{)}_{n_2}\text{-Nu}_2\text{-(L}_3\text{-Nu}_3\text{)}_{n_3}\text{-T}_2\text{-3'}$, en donde:
- cada Nu_1 y Nu_3 es, independientemente, un nucleósido estabilizante;
- al menos 10 Nu_2 son 2'-fluoro nucleósidos;
- 20 cada L_1 , L_2 y L_3 es, independientemente, una ligadura internucleósido;
- cada T_1 y T_2 es, independientemente, H, un grupo protector hidroxilo, un grupo conjugado opcionalmente ligado o un grupo tapado;
- n_1 es desde 0 hasta alrededor de 3;
- n_2 es desde alrededor de 14 hasta alrededor de 22;
- 25 n_3 es desde 0 hasta alrededor de 3; y
- con la condición de que si n_1 es 0 entonces T_1 no es H o un grupo protector hidroxilo, y si n_3 es 0, entonces T_2 no es H o un grupo protector hidroxilo.
- En ciertas modalidades, n_1 y n_3 son cada uno, independientemente, desde 1 hasta alrededor de 3. En ciertas modalidades, n_1 y n_3 son cada uno, independientemente, desde 2 hasta alrededor de 3. En ciertas modalidades, n_1 es 1 o 2 y n_3 es 2 o 3. En ciertas modalidades, n_1 y n_3 son cada uno 2. En ciertas modalidades, al menos uno de n_1 y n_3 es mayor de cero. En ciertas modalidades, n_1 y n_3 es cada uno mayor de cero. En ciertas modalidades, uno de n_1 y n_3 es mayor de cero. En ciertas modalidades, uno de n_1 y n_3 es mayor de uno.
- 30 En ciertas modalidades, n_2 es desde 16 hasta 20. En ciertas modalidades, n_2 es desde 17 hasta 19. En ciertas modalidades, n_2 es 18. En ciertas modalidades, n_2 es 19. En ciertas modalidades, n_2 es 20.
- En ciertas modalidades, desde alrededor de 2 hasta alrededor de 8 de los nucleósidos Nu_2 son nucleósidos estabilizantes. En ciertas modalidades, desde alrededor de 2 hasta alrededor de 6 de los nucleósidos Nu_2 son nucleósidos estabilizantes. En ciertas modalidades, desde alrededor de 3 hasta alrededor de 4 de los nucleósidos Nu_2 son nucleósidos estabilizantes. En ciertas modalidades, 3 de los nucleósidos Nu_2 son nucleósidos estabilizantes.
- 35 En ciertas modalidades, cada uno de los nucleósidos estabilizantes Nu_2 se separa de los nucleósidos estabilizantes Nu_3 por desde 2 hasta alrededor de 8 nucleósidos 2'-fluoro. En ciertas modalidades cada uno de los nucleósidos estabilizantes Nu_2 se separa de los nucleósidos estabilizantes Nu_3 por desde 3 hasta alrededor de 8 nucleósidos 2'-fluoro. En ciertas modalidades cada uno de los nucleósidos estabilizantes Nu_2 se separa de los nucleósidos estabilizantes Nu_3 por desde 5 hasta alrededor de 8 nucleósidos 2'-fluoro.
- 40 En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende desde 2 hasta alrededor de 6 nucleósidos estabilizantes Nu_2 . En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende 3 nucleósidos estabilizantes Nu_2 .
- En ciertas modalidades, cada uno de los nucleósidos estabilizantes Nu_2 se liga en conjunto en una secuencia contigua. En ciertas modalidades, al menos dos de los nucleósidos estabilizantes Nu_2 se separan por al menos uno de los nucleósidos 2'-fluoro. En ciertas modalidades, cada uno de los nucleósidos estabilizantes Nu_2 se separa por al menos uno de los nucleósidos 2'-fluoro.
- 45 En ciertas modalidades, al menos dos secuencias contiguas de los nucleósidos 2'-fluoro Nu_2 se separan por al menos uno de los nucleósidos estabilizantes en donde cada una de las secuencias contiguas tiene el mismo número de los nucleósidos 2'-fluoro.
- 50 En ciertas modalidades, T_1 y T_2 son cada uno, independientemente, H o un grupo protector hidroxilo. En ciertas modalidades, al menos uno de T_1 y T_2 es 4,4'-dimetoxitritilo. En ciertas modalidades, al menos uno de T_1 y T_2 es un grupo conjugado opcionalmente ligado. En ciertas modalidades, al menos uno de T_1 y T_2 es un grupo tapado. En ciertas modalidades, el grupo tapado es un grupo abásico desoxi invertido.
- 55 En ciertas modalidades, un oligonucleótido posicionalmente modificado comprende al menos una ligadura internucleósido modificada. En ciertas modalidades, cada ligadura internucleósido de un oligonucleótido posicionalmente modificado es una ligadura internucleósido modificada. En ciertas modalidades, al menos una ligadura internucleósido de un oligonucleótido posicionalmente modificado es una ligadura internucleósido de fosfortioato. En

ciertas de tales modalidades, cada ligadura internucleósido de un oligonucleótido posicionalmente modificado es una ligadura internucleósido de fosforotioato.

En ciertas modalidades, un motivo posicionalmente modificado se representa por la siguiente fórmula II, que representa un oligonucleótido modificado que consiste en nucleósidos ligados:

5 $T_1-(Nu_1)_{n1}-(Nu_2)_{n2}-(Nu_3)_{n3}-(Nu_4)_{n4}-(Nu_5)_{n5}-T_2$, en donde:

Nu_1 y Nu_5 son, independientemente, nucleósidos 2' estabilizantes;

Nu_2 y Nu_4 son nucleósidos 2'-fluoro;

Nu_3 es un nucleósido modificado en 2';

cada uno de n_1 y n_5 es, independientemente, desde 0 hasta 3;

10 la suma de n_2 y n_4 es entre 10 y 25;

n_3 es entre 0 y 5; y

cada T_1 y T_2 es, independientemente, H, un grupo protector hidroxilo, un grupo conjugado opcionalmente ligado o un grupo tapado.

15 En ciertas modalidades, la suma de n_2 y n_4 es 16. En ciertas modalidades, la suma de n_2 y n_4 es 17. En ciertas modalidades, la suma de n_2 y n_4 es 18. En ciertas modalidades, n_1 es 2; n_3 es 2 o 3; y n_5 es 2.

En ciertas modalidades, Nu_1 y Nu_5 son, independientemente, nucleósidos modificados en 2'.

En ciertas modalidades, Nu_1 es $O-(CH_2)_2-OCH_3$, Nu_3 es $O(CH_2)_2-OCH_3$, Nu_5 $O-(CH_2)_2-OCH_3$, T_1 es H y T_2 es H.

20 En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado complementario a un miARN y que consiste en 22 nucleósidos ligados tiene la Fórmula II seleccionada de la Tabla A, donde cada ligadura internucleósido es una ligadura internucleósido de fosforotioato. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado que tiene una Fórmula II seleccionado de la Tabla A tiene la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 12.

n1	n2	n3	n4	n5	Nu ₁	Nu ₃	Nu ₅	T ₁	T ₂
2	18	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	3	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	4	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	5	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	6	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	7	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	8	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	9	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	10	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	11	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	12	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

2	13	2	3	2	2'- MOE	2'- MOE	2'- MOE	H	H
2	14	2	2	2	2'- MOE	2'- MOE	2'- MOE	H	H
2	2	3	13	2	2'- MOE	2'- MOE	2'- MOE	H	H
2	3	3	12	2	2'- MOE	2'- MOE	2'- MOE	H	H
2	4	3	11	2	2'- MOE	2'- MOE	2'- MOE	H	H
2	5	3	10	2	2'- MOE	2'- MOE	2'- MOE	H	H
2	6	3	9	2	2'- MOE	2'- MOE	2'- MOE	H	H
2	7	3	8	2	2'- MOE	2'- MOE	2'- MOE	H	H
2	8	3	7	2	2'- MOE	2'- MOE	2'- MOE	H	H
2	9	3	6	2	2'- MOE	2'- MOE	2'- MOE	H	H

2	10	3	5	2	2'- MOE	2'- MOE	2'- MOE	H	H
2	11	3	4	2	2'- MOE	2'- MOE	2'- MOE	H	H
2	12	3	3	2	2'- MOE	2'- MOE	2'- MOE	H	H
2	13	3	2	2	2'- MOE	2'- MOE	2'- MOE	H	H
2	8	6	4	2	2'- MOE	2'- MOE	2'- MOE	H	H

- 5 Un oligonucleótido modificado que tiene un motivo gapmero puede tener una región interna que consiste en 2'-desoxinucleótidos ligados, y regiones externas que consisten en nucleósidos modificados 2' ligados. Tal gapmero puede diseñarse para producir desdoblamiento RNasa H de un precursor miARN. La región 2'-desoxinucleósido interna sirve como un sustrato para RNasa H, permitiendo el desdoblamiento del precursor miARN al cual un oligonucleótido modificado es dirigido. En ciertas modalidades, cada nucleósido de cada región externa comprende el mismo nucleósido modificado 2'. En ciertas modalidades, una región externa está comprendida uniformemente por un primer nucleósido modificado 2' y la otra región externa está comprendida uniformemente por un segundo nucleósido modificado 2'.
- 10 Un oligonucleótido modificado que tiene un motivo gapmero puede tener una modificación de azúcar en cada nucleósido. En ciertas modalidades, la región interna está comprendida uniformemente por un primer nucleósido modificado 2' y cada una de las alas está comprendida uniformemente por un segundo nucleósido modificado 2'. En ciertas de tales modalidades, la región interna está comprendida uniformemente de nucleósidos 2'-fluoro y cada región externa está comprendida uniformemente de nucleósidos 2'-O-metoxietilo.
- 15 En ciertas modalidades cada región externa de un gapmero consiste en nucleósidos 2'-O-metoxietilo ligados. En ciertas modalidades, cada región externa de un gapmero consiste en nucleósidos 2'-O-metilo ligados. En ciertas modalidades, cada región externa un gapmero consiste en nucleósidos 2'-fluoro. En ciertas modalidades, cada región externa de un gapmero consiste en nucleósidos bicíclicos ligados.
- 20 En ciertas modalidades, cada nucleósido de una región externa de un gapmero comprende nucleósidos 2'-O-metoxietilo y cada nucleósido de la otra región externa comprende una modificación 2' diferente. En ciertas de tales modalidades, cada nucleósido de una región externa de un gapmero comprende nucleósidos 2'-O-metoxietilo y cada nucleósido de la otra región externa comprende nucleósidos 2'-fluoro. En ciertas de tales modalidades, cada nucleósido de una región externa de un gapmero comprende nucleósidos 2'-O-metilo y cada nucleósido de la otra región externa comprende nucleósidos 2'-fluoro. En
- 25

ciertas de tales modalidades, cada nucleósido de una región externa de un gapmero comprende nucleósidos 2'-O-metoxietilo y cada nucleósido de la otra región externa comprende nucleósidos bicíclicos. En ciertas de tales modalidades, cada nucleósido de una región externa de un gapmero comprende nucleósidos 2'-O-metilo y cada nucleósido de la otra región externa comprende nucleósidos bicíclicos.

5 En ciertas modalidades, los nucleósidos de una región externa comprenden dos o más modificaciones de azúcar. En ciertas modalidades, los nucleósidos de cada región externa comprenden dos o más modificaciones de azúcar. En ciertas modalidades, al menos un nucleósido de una región externa comprende un azúcar de 2'-O-metoxietilo y al menos un nucleósido de la misma región externa comprende un azúcar de 2'-fluoro. En ciertas modalidades, al menos un nucleósido de una región externa comprende un azúcar de 2'-O-metoxietilo y al menos un nucleósido de la misma
10 región externa comprende una porción de azúcar bicíclica. En ciertas modalidades, al menos un nucleósido de una región externa comprende un azúcar 2'-O-metilo y al menos un nucleósido de la misma región externa comprende un azúcar 2'-O-metilo y al menos un nucleósido de la misma región externa comprende un azúcar de 2'-fluoro. En ciertas modalidades, al menos un nucleósido de una región externa comprende un azúcar de 2'-fluoro y al menos un nucleósido de la misma región externa comprende una porción de azúcar bicíclica.

15 En ciertas modalidades, cada región externa de un gapmero consiste en el mismo número de nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, una región externa de un gapmero consiste en un número de nucleósidos ligados diferente al de la otra región externa.

20 En ciertas modalidades, las regiones externas comprenden, independientemente, desde 1 hasta 6 nucleósidos. En ciertas modalidades, una región externa comprende 1 nucleósido. En ciertas modalidades, una región externa comprende 2 nucleósidos. En ciertas modalidades, una región externa comprende 3 nucleósidos. En ciertas modalidades, una región externa comprende 4 nucleósidos. En ciertas modalidades, una región externa comprende 5 nucleósidos. En ciertas modalidades, una región externa comprende 6 nucleósidos. En ciertas modalidades, la región interna consiste en de 17 hasta 28 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, una región interna consiste en de 17 hasta 21 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, una región interna consiste en 17 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, una región interna consiste en 18 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, una región interna consiste en 19 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, una región interna consiste en 20 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, una región interna consiste en 21 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, una región interna consiste en 22 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, una región interna consiste en 23 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, una región interna consiste en 24 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, una región interna consista de 25 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, una región interna consiste en 26 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, una región interna consiste en 27 nucleósidos ligados. En ciertas modalidades, una región interna consiste en 28 nucleósidos ligados.

Ciertos Ensayos de Cuantificación

35 Los efectos de inhibición antisentido de un miARN después de la administración de oligonucleótidos modificados pueden evaluarse por una variedad de métodos conocidos en la técnica. En ciertas modalidades, estos métodos se usan para cuantificar niveles miARN en células o tejidos *in vitro* o *in vivo*. En ciertas modalidades, los cambios en los niveles miARN se miden por análisis de microconfiguración. En ciertas modalidades, los cambios en los niveles miARN se miden por uno de varios ensayos PCR comercialmente disponibles, tales como el ensayo de MicroARN TaqMan® (Applied Biosystems). En ciertas modalidades, la inhibición antisentido de un miARN se evalúa al medir el nivel de mARN y/o proteína de un objetivo de un miARN. La inhibición antisentido de un miARN generalmente resulta en el incremento en el nivel de mARN y/o proteína de un objetivo del miARN.

Ciertos Modelos Experimentales

45 En ciertas modalidades, la presente invención proporciona métodos para usar y/o probar oligonucleótidos modificados de la presente invención en un modelo experimental. En ciertas modalidades, los modelos experimentales se emplean para evaluar la efectividad de los oligonucleótidos modificados de la invención para el tratamiento de fibrosis. Aquellos que tienen experiencia en la técnica son capaces de seleccionar y modificar los protocolos para tales modelos experimentales para evaluar un agente farmacéutico de la invención.

50 Los oligonucleótidos modificados pueden primero probarse en células cultivadas. Los tipos celulares adecuados incluyen aquellos que se relacionan con el tipo celular deseado para el suministro de un oligonucleótido modificado *in vivo*. Por ejemplo, los tipos celulares adecuados para el estudio de oligonucleótidos modificados para el tratamiento de fibrosis incluyen fibroblastos, cardiomiocitos, y células estrelladas.

55 En ciertas modalidades, se evalúa el alcance al cual un oligonucleótido modificado inhibe la actividad de un miARN en células cultivadas. En ciertas modalidades, la inhibición de actividad miARN puede evaluarse al medir los niveles del miARN. Como alternativa, el nivel de un objetivo miARN predicho o validado puede medirse. Una inhibición de actividad miARN puede resultar en el incremento en el mARN y/o proteína de un objetivo miARN. Además, en ciertas modalidades, ciertos resultados fenotípicos pueden medirse. Por ejemplo, los resultados fenotípicos adecuados incluyen inhibición de proliferación celular, la inducción de muerte celular, y/o la inducción de apoptosis.

60 Siguiendo la identificación *in vitro* de un oligonucleótido modificado que inhibe efectivamente la actividad de un miARN, los oligonucleótidos modificados se prueban además en modelos experimentales *in vivo*.

Los modelos experimentales adecuados para la prueba de agentes farmacéuticos para el tratamiento de fibrosis, incluyendo agentes farmacéuticos que comprenden oligonucleótidos modificados complementarios a un miR-122, incluyen un modelo de hipertrofia inducida de sobrecarga de presión, descrito en la presente.

Un modelo experimental adicional para la prueba de agentes farmacéuticos para el tratamiento de fibrosis incluye, pero no se limita a, el modelo de dieta deficiente de metionina colina (MCD, por sus siglas en inglés) (ver, por ejemplo, Yamaguchi *et al.*, *Hepatology*, 2008, 47, 625-635). Los ratones db/db espontáneamente desarrollan obesidad, diabetes, e hígados grasos. Alimentar a tales ratones con una dieta MCD induce esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y fibrosis hepática en de 4 hasta 8 semanas. Los oligonucleótidos modificados que tienen nucleobase complementaria a un miARN se prueban en este modelo para sus efectos en fibrosis hepática.

Los siguientes ejemplos se presentan con el objeto de ilustrar más completamente algunas modalidades de la invención. Sin embargo, en ningún caso debe considerarse que limitan el amplio alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Un papel para miR-21 en enfermedad cardiaca

El análisis de microconfiguración en un modelo de ratón transgénico de insuficiencia cardiaca (sobreexpresión restringida del corazón del receptor β 1-adrenérgico (Engelhardt *et al.*, 1999)) revela desregulación progresiva de la clasificación de expresión microARN cardiaca con severidad incrementada de la enfermedad (Fig. 1a). Mientras que la expresión de miR-21 fue modesta en miocardio normal, este microARN estuvo entre los microARN regulados más fuertes en la insuficiencia del corazón. De hecho, en ratones con insuficiencia cardiaca de fase terminal, miR-21 fue el único microARN sobrerregulado más fuerte (Fig. 1a). El análisis de inmunotransferencia Quantitative Northern confirma sobrerregulación de miR-21 en los ratones y además revela una sobrerregulación marcada en insuficiencia cardiaca humana (Fig. 1b, 1c). La expresión incrementada del precursor miR-21 como se evalúa por la inmunotransferencia Northern sugiere un mecanismo transcripcional. De esta manera, el promotor miR-21 humano se estudió en más detalle. Una región del promotor miR-21 se identificó y se conserva altamente en varias especies (Fig. 4a). Los estudios en la expresión de miR-21 humana (Fig. 4a-4c) confirma su regulación transcripcional por dos factores de transcripción, proteína del elemento de respuesta de calcio/cAMP (CREB) y factor de respuesta de suero (SRF), que se activan clásicamente durante la respuesta de tensión cardiaca. La eliminación de CREB y mutación de los sitios enlazados SRF en el promotor miR-21 resultan en expresión marcadamente disminuida de miR-21 en respuesta a la estimulación del suero, indicando un papel principal para estos dos factores de transcripción en la regulación miR-21 (Fig. 4c). Un papel esencial para miR-21 en morfología y función cardiacas se detectó por un enfoque a base de morfolino en una pantalla sesgada para eliminar diversos microARN expresados de forma ubicua en pez cebra. La eliminación de miR-21 conduce a una insuficiencia drástica de la estructura y función cardiacas (Fig. 5). Más de 95% de los animales inyectados muestran efusiones pericárdicas masivas (Fig. 5a, inserción, y 5b) y función ventricular dañada como se determina por microscopia de vídeo (Fig. 5c).

Para estudiar estas funciones esenciales de miR-21 en corazón mamífero en más detalle más detalle, los inventores modulan la expresión de miR-21 en cardiomiocitos aislados. Los precursores miR-21 sintéticos transfectados por los inventores así como inhibidores miR-21 antisentido, alcanzan de manera rutinaria > 95% de eficiencia de transfección del suministro de oligonucleótido (Fig. 6a). La sobreexpresión de miR-21 conduce a un potenciamiento sólido de miR-21 maduro, mientras que la inhibición de miR-21 completamente suprime la expresión endógena de miR-21 como se determina por el análisis de inmunotransferencia Northern (Fig. 6b). Sin embargo, ni el potenciamiento ni la supresión de los niveles miR-21 en los cardiomiocitos afectan significativamente la morfología, tamaño o número de cardiomiocitos de rata primarios en condiciones de descanso o en condiciones de hipertrofia de cardiomiocito (Fig. 1d). Los ratones transgénicos miR-21 específicos de cardiomiocito que sobreexpresan miR-21 25 veces con relación a los compañeros de camada de tipo natural que no despliegan fenotipo cardiaco obvio con estructura intacta del miocardio ventricular izquierdo y ausencia de fibrosis intersticial (Fig. 1e, inferior). A diferencia de la expresión incrementada sustancialmente de miR-21 en la insuficiencia cardiaca, estos datos muestran que la manipulación de los niveles de expresión miR-21 en cardiomiocitos aislados y modelos de ratones transgénicos miR-21 específicos de cardiomiocito no consiguen corroborar una función importante de miR-21 en el corazón como se indica por los efectos observados en pez cebra y la expresión incrementada sustancialmente de miR-21 en la insuficiencia cardiaca. Por lo tanto, los inventores después exploran un posible papel de miR-21 en un tipo celular de no cardiomiocito, por ejemplo fibroblastos cardiacos. Usando hibridación *in situ*, las señales miR-21 débiles se detectaron en miocardio normal, mientras que en la insuficiencia de miocardio la señal de hibridación se potenció enormemente. En una magnificación alta, la señal de hibridación se restringió principalmente a células intersticiales pequeñas, presumiblemente fibroblastos cardiacos. Usando un procedimiento de preformación en placas, los inventores fraccionan corazones de rata neonatales en una fracción de cardiomiocito y fibroblasto. Efectivamente, los inventores detectan expresión endógena de miR-21 principalmente en fibroblastos cardiacos (Fig. 1f).

Ejemplo 2: Señalización ERK de fibroblasto cardiaco deprimido miR-21

La expresión MiR-21 se incrementa selectivamente en varios cánceres humanos (Lu *et al.*, 2005; Iorio *et al.*, 2005) y se mostró que contribuía con el crecimiento y extensión del tumor por diversos mecanismos en células diferentes. Ya que miR-21 aparece para dirigir los distintos mARN en una manera específica tipo célula, los inventores dediden investigar los objetivos miR-21 específicos del corazón potenciales. Usando un enfoque bioinformático los inventoras separan por exclusión diversas bases de datos microARN para objetivos miR-21 potenciales con secuencias de semilla que

comprenden 3' UTR y nucleótidos flanqueados igualados y enfocan este análisis en candidatos que se sabe que tienen expresión cardiaca. Un resumen se describe en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

5

Símbolo del gen	Nombre del gen	Expresión cardiaca (Referencia ID)	Número de especies conservadas (miRBase)	Objetivo predicho (miRBase)	Objetivo predicho (PicTar)	Coincidencia de semilla para miR-21 (barrido objetivo)
<i>Spry1</i>	homólogo de Sprouty 1	15306693	7	sí	sí	8 mer
<i>Tgfb1</i>	factor de crecimiento transformante, beta inducido	10913330	7	sí	sí	8 mer
<i>Krit1</i>	KRIT1, que contiene repetición de anquirina	16455310	7	sí	sí	7 mer
<i>Pitx2</i>	factor 2 de transcripción del homeodominio de tipo apareado	16836994	7	sí	sí	7 mer
<i>Fas1</i>	ligando Fas (superfamilia TNF, miembro 6)	16698421	7	sí	sí	7 mer
<i>Nfib</i>	factor nuclear I/B	9056636	7	sí	no	7 mer
<i>LnX1</i>	ligando de la proteína numb X1	17118964	7	sí	no	7 mer
<i>Rtn4</i>	reticulón 4	16202479	8	sí	no	7 er

Una separación por exclusión para objetivos miR-21 teóricos revela 22 genes objetivo potenciales conocidos, de los cuales 8 se mostraron previamente para expresarse dentro del tejido cardiaco. La combinación de tres herramientas de predicción objetivo diferentes identifica *Spry1* (*Sprouty1*) como un candidato altamente probable. *Sprouty1* (*SPRY1*), un inhibidor conocido de la trayectoria Ras/MEK/ERK (Hanafusa *et al.*, 2002, Casci *et al.*, 1999) emerge como un objetivo potencial debido a su registro alto y nivel de expresión importante en el corazón (Tabla 1). La 3'UTR del *Spry1* mRNA contiene diversos sitios enlazados microARN predichos, de los cuales solamente uno corresponde a un microARN altamente sobreexpresado durante la enfermedad cardiaca (miR-21, ver Fig. 7). Para determinar el tipo celular en el cual *Spry1* se expresa, los inventores emplean un alelo de *Spry1*, en el cual el gen *lacZ* reemplaza parte de la secuencia de codificación *Spry1*. Los ensayos para la expresión *lacZ* muestran tinción prominente en el corazón de ratón adulto (Fig 2a). Una magnificación superior identifica un patrón con manchas de la expresión *Spry1* que se origina en los fibroblastos intersticiales (Fig 2a, panel inferior). De esta manera, tanto miR-21 como su objetivo supuesto, *Spry1*, se coexpresan en fibroblastos cardiacos, y no en la fracción de cardiomiocito. De acuerdo con estas observaciones, no se halló subregulación de la expresión *SPRY1* detectable en ratones transgénicos que sobreexpresan miR-21 en una manera específica de cardiomiocito. Además, CREB cardiaco, el activador transcripcional de la expresión de miR-21 (Fig. 4) se localiza exclusivamente en fibroblastos. Los inventores luego prueban la relevancia de estos hallazgos para la enfermedad humana. Efectivamente, el análisis de muestras de tejido cardiaco ventricular izquierdo en pacientes con insuficiencia cardiaca en etapa terminal debido a cardiomiopatía dilatada idiopática demuestra expresión de miR-21 incrementada (Fig. 1c) y represión importante de la expresión de la proteína

10

15

20

SPRY1 (Fig. 2b). Estos hallazgos se acompañaron por la activación de ERK-MAPcinasa, como se evidencia por una relación fosfo-ERK/ERK incrementada (Fig. 2b).

Las funciones miR-21 se caracterizaron luego en co-cultivos de fibroblastos intersticiales y los cardiomiocitos para imitar la composición de tejido cardíaco intacto. Los inventores evalúan la función miR-21 por transfección de moléculas o inhibidores del precursor sintético miR-21. Incrementar el miR-21 induce una represión fuerte de la expresión de proteína SPRY1 y aumenta la activación ERK-MAPcinasa incrementada Fig. 2c). El silenciamiento Spry1 mediado por SiARN igualmente resulta en activación ERK-MAPcinasa (Fig. 2d). Los inventores después evalúan si la desrepresión mediada por miR-21 de señalización ERK-MAPcinasa de fibroblasto deberá ser suficiente para afectar a la supervivencia de fibroblasto. De acuerdo con un posible papel de señalización de ERK-MAPcinasa en fibrosis de miocardio, el potenciamiento de los niveles miR-21 promueve la supervivencia de fibroblasto cardíaco, mientras que la supresión de miR-21 endógeno induce muerte celular apoptótica (Fig. 2e). Los inventores también encuentran que la regulación basada en miR-21 de la expresión SPRY1 es crítica para la función secretoria de fibroblastos cardíacos, ya que tanto la sobreexpresión de miR-21 así como silenciamiento mediado por siARN de la expresión SPRY1 aumentan significativamente la secreción del factor 2 del crecimiento de fibroblasto (FGF2) en el sobrenadante (Fig. 2f). Este estudio de esta manera delinea un paradigma de señalización novedoso en la insuficiencia cardíaca, donde la reexpresión de miR-21 durante la enfermedad cardíaca aumenta la actividad ERK-MAPcinasa a través de la inhibición de SPRY1. En el corazón de mamífero, este mecanismo puede regular la supervivencia del fibroblasto y por ello gobernar críticamente el alcance de la fibrosis intersticial y remodelación cardíaca.

Ejemplo 3: Silenciamiento terapéutico de miR-21 *in vivo*

Para evaluar la función de miR-21 *in vivo*, en un marco normal y en insuficiencia cardíaca, la actividad miR-21 se inhibió usando oligonucleótido modificado complementario a miR-21 (antagonista miR-21). Un modelo de ratón con hipertrofia inducida con sobrecarga de presión se usó como un modelo para la insuficiencia cardíaca humana. En este modelo una respuesta de tensión cardíaca reproducible se alcanza a través de constricción transaórtica (TAC). Este modelo se parece altamente a la insuficiencia cardíaca humana debido a su patrón de igualado tanto de cambios microARN como mRNA en los perfiles de expresión globales (Thum *et al.* 2007).

Para determinar la ubicación de antagomir-21 dentro del corazón, un antagomir-21 etiquetado Cy-3 se inyectó intravenosamente por medio de un catéter en la vena yugular. La tinción fuerte en todo el miocardio ventricular izquierdo se observó (Fig. 3a), indicando que los oligonucleótidos modificados complementarios a miR-21 alcanzan la distribución para el tejido cardíaco. El antagonista miR-21 comprende azúcares 2'-O-metilo en cada nucleósido, dos ligaduras de internucleósido fosforotioato en el extremo más cercano a 5' de los oligonucleótidos, tres ligaduras de internucleósido fosforotioato en el extremo más cercano a 3' del oligonucleótido, y un colesterol ligado a través de una ligadura de hidroxiprolinol. Los antagonistas miR-21 tienen la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 12. Los ratones operados TAC o no tratados (simulado) se trataron con antagomir-21 o un oligonucleótido de control en dosis de 80 mg/kg durante tres días consecutivos. El tratamiento con antagomir-21 reprime fuertemente la expresión cardíaca elevada de miR-21 durante hasta tres semanas como se determina en las Northern Blots (Fig. 3b) y análisis PCR en tiempo real (Fig. 8). Este tratamiento invirtió completamente la subregulación inducida por TAC de SPRY1 y la activación de ERK-MAPcinasa durante la sobrecarga de presión a niveles observados en ratones operados de forma simulada (Fig. 3c). La fibrosis intersticial y peso del corazón se incrementaron significativamente tres semanas después de TAC en ratones no tratados, pero se atenuaron fuertemente por el tratamiento antagomir-21 (Figs. 3d, 3e). Efectivamente, el contenido de colágeno del miocardio se normalizó esencialmente por el tratamiento antagomir-21. Además, donde el peso del corazón se duplicó tres semanas después de TAC, el tratamiento antagomir-21 previno la hipertrofia. En ratones operados de forma simulada, el tratamiento con antagomir-21 no resulta en cambios importantes en peso cardíaco o fibrosis intersticial, no indicando efecto discernible del antagonismo miR-21 en el corazón normal o cardiotoxicidad patente del tratamiento de antagomir-21. Después de la operación TAC y tratamiento de antagomir-21, el análisis de transcriptoma global revela normalización de varios genes desregulados (Fig. 3f). Específicamente, los genes altamente sobreexpresados durante la fibrosis cardíaca tales como colágeno 1 α 1, colágeno 3 α 1, biglicano, fibromodulina o factor del crecimiento de tejido conectivo se redujeron después de la inhibición específica de miR-21 al 42%, 39%, 44%, 38% y 37%, respectivamente (Fig. 3f panel inferior). En estudios adicionales, la función cardíaca se evaluó por ecocardiografía. Los diámetros diastólicos del extremo ventricular izquierdo incrementan significativamente tres semanas después de TAC y el acortamiento fraccionado se dañó (Fig. 3g), como se observa comúnmente en la insuficiencia cardíaca humana. Cuando se compara con los controles, el tratamiento de antagomir-21 previene la dilatación ventricular izquierda y parámetros normalizados de acortamiento fraccionado esencialmente a niveles observados en animales operados de forma simulada (Fig. 3g). Los resultados similares se obtuvieron con tratamiento de antagomir-21 en un modelo de enfermedad cardíaca inducida por isoproterenol.

Un experimento adicional se realizó, en el cual los ratones se sometieron a sobrecarga de presión del ventrículo izquierdo durante tres semanas antes del tratamiento con antagomir-21. Durante este periodo los animales muestran hipertrofia ventricular izquierda importante, fibrosis y función cardíaca danada. Después de este periodo de tiempo de tres semanas, los ratones se trataron con antagomir-21 y se observaron durante tres semanas adicionales. Mientras que los animales tratados con control muestran insuficiencia progresiva de la función ventricular izquierda así como fibrosis intersticial e hipertrofia cardíaca, los animales tratados con antagomir-21 muestran atenuación importante de la insuficiencia de la función cardíaca así como regresión de hipertrofia cardíaca y fibrosis.

Estos datos muestran un papel crítico para miR-21 y SPRY1 derivados de fibroblasto en el corazón. La expresión

anormal de miR-21 en fibroblastos cardiacos inhibe la expresión de proteína SPRY1, resultando en aumento de la actividad de cinasa ERK-MAP. A su vez, esto potencia la supervivencia del fibroblasto cardiaco y por ello la remodelación de fibrosis intersticial y cardiaca que es característica de la insuficiencia cardiaca. Este modelo (resumido en la Fig. 3h) asigna un papel principal para la activación del fibroblasto cardiaco en la enfermedad de miocardio. El miR-21 antagonizante en el modelo de murino de la enfermedad cardiaca previene el deterioro estructural y funcional. En consecuencia, la presente invención proporciona métodos para el tratamiento de fibrosis, que comprende administrar un oligonucleótido modificado complementario a miR-21. La presente invención además proporciona métodos para el tratamiento de fibrosis relacionados con la enfermedad cardiaca, que comprende administrar un oligonucleótido modificado complementario a miR-21.

Ejemplo 4: Regulación miR-21 de la trayectoria MAPK de cinasa regulada por señal extracelular

La transformación maligna de células normales hasta con cáncer requiere la adquisición de diversos rasgos oncogénicos tales como división celular no controlada, resistencia a la muerte celular programada (apoptosis), invasión y angiogénesis. Las alteraciones genéticas a menudo resultan en activación constitutiva de las trayectorias de transducción de señal cadena abajo comunes tales como la cascada de cinasa de proteína activada con mitógeno (MAP) que involucran c-RAF-1, MEK-1, ERK 1/2, p38 y JNK y otros. Las cascadas de cinasa de proteína activada de mitógeno (MAPK) son trayectorias de señalización clave involucradas en la regulación de la proliferación celular normal, supervivencia y diferenciación. La regulación aberrante de cascadas MAPK contribuye a cáncer y otras enfermedades humanas. En particular, la trayectoria MAPK de cinasa regulada con señal extracelular (ERK) ha sido el objetivo de una búsqueda intensa que lleva al desarrollo de inhibidores farmacológicos para el tratamiento de cáncer. En células normales, está bien establecido que la activación de la cinasa ERK 1/2 se regula por el receptor de tirosina cinasas tal como receptores EGF y receptores del factor de crecimiento derivados de placas (PDGFR) por medio de la activación de Ras, que a su vez activa la cascada RAF-1/MEK-1/ERK 1/2. Debido a que esta trayectoria de transducción de señal está hiperactivada en muchos cánceres humanos, inhibidores del receptor de tirosina cinasas, Ras, c-RAF-1 y MEK-1 todos se han desarrollado y están en varias etapas del desarrollo. El tratamiento de cáncer puede por lo tanto ser posible al administrar una cantidad efectiva de un inhibidor de la trayectoria RAF-1/MEK-1/P-ERK 1/2.

La Sprouty (SPRY) es una familia de proteínas intracelulares que son reguladores endógenos de las trayectorias del receptor de tirosina cinasa tales como la trayectoria de cinasa Ras/MAP. La especie mamífera expresa cuatro isoformas de Sprouty, que actúan como inhibidores de la diferenciación celular inducida por el factor de crecimiento, migración, y proliferación. Los inventores identifican sprouty-1 para inhibir la fosforilación ERK que puede resultar en la modulación de la formación del tumor. Los inventores sugieren que la sobrerregulación de miR-21 en muchos cánceres humanos inhibe sprouty-1 activando de esta manera ERK para resultar en formación y progresión del tumor potenciado. El antagonismo de miR-21 (por ejemplo por un antagomir-21) es por lo tanto capaz de prevenir y/o atenuar la formación y/o progresión del tumor.

Ejemplo 5: Procedimientos Experimentales

Análisis de expresión (configuración MicroARN, Análisis Affymetrix Genechip, Northern Blotting, PCR de tiempo real)

Los perfiles de expresión MicroARN (Castoldi *et al.*, 2007) y mRNA global se generaron de preparaciones de ARN de miocardio ventricular izquierdo de murino. Los microARN desregulados se confirmaron por Northern Blotting y PCR de tiempo real específico de bucle troncal. Tanto para configuraciones de oligonucleótido como para configuraciones de microARN con manchas, el análisis de datos se hizo con el uso de paquetes R del proyecto Bioconductor (www.bioconductor.org) como se describe previamente (Thum *et al.*, 2007).

Análisis del promotor miR-21

24 horas después de aislamiento, las células se transfectaron con 1 µg de plásmido reportero usando un método de transfección liposomal establecido (Lipofectamine, Invitrogen, EE. UU.). Después de 12 horas el medio se cambió a medio libre de FCS. 24 horas después las células se trataron ya sea con FCS al 5% durante 8 horas mientras que el otro grupo se cultivó sin FCS. La actividad de luciferasa se midió en lisados celulares usando el Kit de Luciferasa Doble (Promega, Alemania) de acuerdo con la recomendación del fabricante.

Experimentos de aislamiento, cultivo y transfección de cardiomiocito

Los cardiomiocitos neonatales se aislaron como se describe previamente (Merkle *et al.*, 2007). El tamaño del cardiomiocito se determinó de imágenes registradas digitalmente usando el paquete de software AxioVision LE 4.1 (Carl Zeiss Vision GmbH, Jena, Alemania). Los cultivos de cardiomiocito se transfectaron con precursor y los inhibidores de miR-21 (Ambion, EE. UU.) o siARN contra Sprouty1 (Promega, Alemania). Usando condiciones de cultivo apropiadas los inventores también realizan experimentos con fibroblastos cardiacos y cocultivos de fibroblasto/cardiomiocito.

Mantenimiento de pez cebra, microinyección de oligonucleótidos antisentido de morfolino y determinación de la función cardiaca

Un oligonucleótido modificado de morfolino estándar se dirigió contra el dre-miR-21 maduro (MO-1 = 5'-GCCAACACCAGTCTGATAAGCTA-3') y también un oligonucleótido modificado con morfolino bloqueado múltiple se usó para interferir con etapas múltiples en el procesamiento y función de miR-21 (MO-2 = 5'-TGTAACAGCCAACACCAGTCTGATAAGCTAT-3'). Un oligonucleótido de control estándar (control MO) (GENETOOLS, LLC) se inyectó en la misma concentración como un control negativo. Los morfolinos se microinyectaron en embriones de pez cebra de tipo natural en la etapa de una célula y morfología general y especialmente la función cardíaca se evaluó en varios puntos de tiempo durante el desarrollo. Las imágenes y películas se registraron y el acortamiento fraccionado ventricular se midió 48, 72, 80, 96 y 120 horas después de la fertilización (hpf) esencialmente como se describe (Rottbauer *et al.*, 2005).

Modelos de ratón de hipertrofia e insuficiencia cardíaca

La constricción transaórtica se realizó por métodos rutinarios. Los ratones transgénicos del receptor Beta1-adrenérgicos (línea TG4) se han descrito en detalle previamente (Engelhardt *et al.*, 1999).

Muestras de corazón humano

Los inventores examinan el tejido cardíaco de pacientes que experimentan trasplante del corazón debido a la insuficiencia cardíaca de etapa terminal debido a la cardiomiopatía dilatada y, con el objetivo de comparar, muestras del corazón adulto sano. Inmediatamente después de la explantación, las piezas del tejido se extrajeron de los ventrículos izquierdos, y el tejido extirpado se congeló por choque en nitrógeno líquido y almacenó a -80°C hasta el análisis.

Métodos de predicción del objetivo microARN

Las bases de datos del microARN y herramientas de predicción del objetivo miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>), PicTar (<http://pictar.bio.nyu.edu/>) y TargetScan (<http://www.targetscan.org/index.html>) se usaron para identificar los objetivos de microARN potenciales.

Western blotting y análisis de fibrosis cardíaca

Los lisados de proteína de corazones explantados o cocultivos se prepararon como se describe (Buitrago *et al.*, 2005) y la expresión de Spry1, ERK1/2, fosfoERK1/2 y G beta detectados como se describe en la presente. Para análisis de morfología y fibrosis los corazones se fijaron en formalina al 4% y se incluyeron en parafina. Las secciones del tejido (5 µm) del LV se tiñeron con hematoxilina y eosina o rojo picrosiros. Las secciones de rojo picrosiros se examinaron usando un microscopio Nikon ECLIPSE 50i equipado con filtros para proporcionar iluminación polarizada de forma circular. Las imágenes del tejido se obtuvieron con los lentes objetivos 20X, se registraron en una cámara digital enfriada (DS-5Mc, Nikon), y se analizaron usando software de análisis de imagen SigmaScan Pro 5.0 (SPSS Inc., EE.UU.). El contenido de colágeno se calculó como un porcentaje del área de cada imagen (expresada en píxeles).

Ratones transgénicos α MHC-miR-21

Los ratones transgénicos que sobreexpresan miR-21 se generaron por inyección pronuclear de oocitos fertilizados de ratones FVB/N con un constructo de transgen que contiene la secuencia de miR-21 maduro, flanqueado por 154 bp cadena arriba y 136 bp cadena abajo de la secuencia del precursor nativo bajo el control del promotor de cadena pesada de amiosina de murino (α MHC).

Tinción X-gal de miocardio de ratones Spry-lacZ

Los corazones se recolectaron de ratones Spry1-lacZ +/- y fijaron durante 2h en PBS que contiene formaldehído al 2% y glutaraldehído al 0.05%. Posteriormente, los corazones se enjuagaron 4 veces durante 30 min en Na-desoxicolato al 0.01%, Nonidet P-40 al 0.02%, MgCl₂ 2mM y EGTA 2mM en PBS. Para la detección de la actividad de β -galactosidasa los corazones se incubaron en solución de enjuague que contenía 0.5 mg/ml de X-gal, K₃Fe(CN)₆ 10 mM, y 10 mM, K₄Fe(CN)₆ a 37°C. Para montar el análisis completo los corazones se transfirieron a glicerol al 30% y las imágenes digitales se tomaron usando una cámara Digital Nikon DXM1200F y software ACT-1. Para análisis histológico los corazones se deshidrataron en isopropanol, se limpiaron en xileno y se transfirieron a parafina. Las secciones de parafina 10 µm se generaron usando protocolos estándares y documentaron.

Inyección y detección de oligonucleótidos modificados

Un catéter de la vena yugular se insertó permanentemente en ratones C57/Bl6 macho (10-12 semanas de edad) antes del procedimiento TAC. 24h postTAC 80mg/kg/d de oligonucleótido modificado se inyectó diariamente durante 3 días a través del catéter de la vena yugular. Como un control positivo para suministro efectivo (oligonucleótido modificado etiquetado Cy3) se inyectó en 80 mg/kg una vez en el catéter y el corazón se extrajo 3h después, se fijó y la tinción Cy3 se observó por microscopio de fluorescencia.

Apoptosis de fibroblastos y producción de FGF2

Después del tratamiento con precursores miR-21, inhibidores o controles respectivos, los fibroblastos positivos de Anexina V se midieron por análisis FACS (kit Anexina V-FLUOS, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). El ensayo inmunosorbente ligado a la enzima (ELISA) se realizó para cuantificar concentraciones FGF2 en sobrenadantes de fibroblastos cardíacos modulados por miR-21. El ensayo FGF2 se llevó a cabo usando el kit de inmunoensayo Básico Quantikine FGF (R&D Systems, Minneapolis, EE. UU.) de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Análisis estadístico

Los datos promedio se presentan como media \pm SEM. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el software Prism (GraphPad, San Diego, CA) o paquete StatView (SAS Institute Inc., Cary, EE. UU.). ANOVA seguido por la prueba Bonferroni y prueba t de Student se usaron según procediera. Las diferencias se consideraron importantes cuando $P < 0.05$ y se indican por un asterisco. *indica $p < 0.05$, ** indica $p < 0.01$, *** indica $p < 0.005$.

Aislamiento ARN, RT-PCR en tiempo real y Northern blotting

Para la extracción del ARN total de tejidos congelados o cultivos celulares el Mini kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los MiARN se aislaron por TRIZOL (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) o un Kit de Aislamiento miARN (mirVana™, Ambion, EE. UU.). La integridad del ARN aislado se verificó con electroforesis en gel de agarosa desnaturalizado o electroforesis capilar (Bioanalyzer 2100; Agilent) como se describe (Thum y Borlak, 2004). Para PCR en tiempo real los inventores emplean un Sistema de Detección PCR en Tiempo Real iCycler iQ™ (BioRad, Alemania).

Los inventores usan estructuras de bucle madre con objetivo específico y cebador de transcripción inversa, y después de transcripción inversa usan sondas de hibridación TaqMan específicas para cuantificar la expresión de miR-21 (ensayo MicroARN miR-21 TaqMan, Applied Biosystems, Foster City, EE. UU.). La molécula ARN pequeña U6B nuclear pequeña (RNU6B) se amplificó como un control (Controles de ensayo de MicroARN Taqman, Applied Biosystems, Foster City, EE. UU.). Todas las muestras miARN se derivaron de aislamientos que comprenden la misma concentración de ARN total.

Para análisis Northern Blot, 3 μ g de ARN total se cargaron en acrilamida 15%, urea 6 M, y geles TBE a lo largo de un marcador de ADN apropiado. Después de la electroforesis, el ARN se transfirió a una membrana de nailon (Qiabrane Nylon, Qiagen) usando transferencia semiseca. Las membranas luego se prehibridaron durante 1h a 65°C en solución amortiguadora de hibridación (Solución amortiguadora de Hibridación ULTRAhyb-Oligo, Ambion, EE. UU.). Los oligonucleótidos LNA (sondas de detección de Configuración miRCURY LNA; Exiqon) que se etiquetaron previamente con T4 cinasa (Exiqon) y 32P-ATP luego se agregaron a la solución amortiguadora y las membranas se hibridaron durante la noche a 42°C. Posteriormente, la inmunotransferencia se lavó tres veces a temperatura ambiente durante 3 minutos (en 0.2x SSC), seguido por una vez a 42°C durante 15 minutos. Posteriormente las membranas se expusieron en un fosfoprocesador de imágenes.

Análisis de la expresión microARN

Para los análisis de expresión de microARN de microconfiguración los inventores purifican separadamente microARN usando el sistema Fraccionador flashPAGE (Ambion, EE. UU.). El microARN obtenido de 8 μ g de ARN total se etiquetó con el pigmento Cy3 (Molecular Probes, Carlsbad, Calif) por el uso del Kit de Etiquetado de microARN mirVana (Ambion, EE. UU.) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Cada muestra se hibridó a una configuración separada. Los procedimientos de hibridación de microconfiguración de microARN, purificación y enriquecimiento de microARN, y etiquetado e hibridación de microconfiguración se realizaron de acuerdo con los manuales Ambion mirVana (www.ambion.com/techlib/prot/) o como se describe 2. La adquisición de datos se hizo con el uso del Software ScanAlyze (Eisen-Lab, Lawrence Berkeley National Lab (LBNL), Berkeley, EE. UU.). Como alternativa, 5 μ g de ARN total se etiquetaron con una ligadura ARN conjugada Cy3 (Dharmacon, EE. UU.) e hibridaron a una plataforma de microconfiguración para el perfil amplio del genoma de miARN [miChip; sondas de captura inmovilizadas en la configuración correspondiente a (211 humano, 51 murino) miARN humanos únicos como se deposita en la versión miRbase 6.1]. Las intensidades de la señal de hibridación se adquirieron usando el escáner Axon (4000B, Molecular Dynamics) con ajustes de fotomultiplicador idénticas. Los análisis adicionales se realizaron usando software Genepix 6 (Molecular Dynamics) y Excel. La expresión de miR-21 se validó por los análisis RT-PCR TaqMan específicos y análisis de Northern Blot.

Análisis de transcriptoma global

Para los análisis de transcriptoma, la transcripción inversa, síntesis de segunda hebra, y limpieza de cADN de hebra doble se realizaron de acuerdo con los protocolos Affymetrix (kit de síntesis de cADN de un ciclo, Affymetrix, EE. UU.) partiendo de 2 μ g de ARN total (n=4 corazones de control después de la cirugía simulada, n=4 ventrículos izquierdos después de TAC y tratamiento de placebo; n=4 ventrículos izquierdos después de TAC y tratamiento antagonista miR-21). La síntesis de cARN de etiqueta biotina se realizó con el uso del kit de etiquetado IVT (Affymetrix, EE. UU.). La concentración de cARN se determinó y la distribución de los tamaños del fragmento cARN se verificó por electroforesis de gel. 15 μ g de cARN fragmentado se usaron para hibridación en el genoma de ratón 430 GeneChip 2.0 (Affymetrix, EE. UU.). El análisis de datos de los paquetes R de los estudios de configuración del proyecto Bioconductor (www.bioconductor.org) se usaron. Se normalizaron las intensidades de señal resultantes por la estabilización de variancia. La calidad de todos los conjuntos de datos se probó y el análisis estadístico se realizó

usando el paquete limma (Modelos Lineales para Análisis de Microconfiguración) para seleccionar los genes expresados diferencialmente.

Experimentos de cocultivo cardiacos y procedimientos de transfección de microARN/siARN

Los cardiomiocitos de ratas neonatales se aislaron y cultivaron según se describe (Merckle *et al.*, 2007). Para análisis de modulación miR-21 en el tamaño del cardiomiocito, los cultivos de cardiomiocito puro se usaron por la adición de las etapas de preformación de placas para excluir contaminaciones de no cardiomiocito principales (por ejemplo fibroblastos). Más del 95% de los cardiomiocitos cultivados tiñeron positivo para actinina, lo cual demuestra alta pureza de los cultivos celulares. El miR codificado (control prenegativo #2, Ambion; 50 nmol/L, 72 horas), las moléculas precursoras miR-21 (pre-MiR, Ambion; 50 nmol/L, 72 horas) o antagonistas miR-21 (anti-miR, Ambion; 50 nmol/L, 72 horas) se transfectaron por un método basado en liposoma (Lipofectamine, Invitrogen, EE. UU.; ver 6 para detalles). Los cardiomiocitos se cultivaron con FCS bajo (0.1%, condición de control) o 48 h con FCS alto (5.0%) para inducir hipertrofia de cardiomiocito. Para la determinación del tamaño celular, el área de la superficie de los cardiomiocitos neonatales (72 horas después de la transfección) se calculó en un formato de placa de 96 pozos (densidad de sembrado 40.000 células/pozo) con el uso del paquete AxioVison Rel 4.4 (Carl Zeiss GmbH, Jena, Alemania). Los datos se expresan como media \pm SEM.

Para imitar las condiciones *in vivo* cardiacas los inventores usan un sistema de cocultivo de los cardiomiocitos y fibroblastos cardiacos al ignorar la etapa de preformación de placas como se describe arriba. Aquí, los inventores estudian en detalle la expresión de la activación Spry-1 y Erk después de la transfección de miR codificado (50 nmol/L, 72 horas), moléculas precursoras miR-21 (50 nmol/L, 72 horas) o antagonistas miR-21 (50 nmol/L, 72 horas). En experimentos separados el siARN codificado o un cóctel siARN específico contra Spry1 (tres microARN diferentes, 16.7 nmol/L cada uno) se transfectaron para el cocultivo. La eficiencia de la transfección se monitorizó por las mediciones PCR en tiempo real (Ensayos MicroARN TaqMan, Applied Biosystems) y Northern Blotting.

Herramientas de predicción objetivo microARN

El algoritmo miRanda (Griffiths-Jones *et al.*, 2006) se usó para seleccionar los sitios enlazados miR-21 potenciales en secuencias 3' UTR del genoma humano y de murino. Posteriormente, la normalización Karlin-Altschul se realizó (miRBase Targets versión 4.0; <http://microrna.sanger.ac.uk/targets/v4/>). En detalle, los inventores usan la base de datos miRBase (Versión 4, Sanger Institute, EE. UU.) y los objetivos miR-21 potenciales seleccionados al usar los algoritmos "número alto de especies conservadas; >6", "valor p bajo; <0.001" y registro miRBase alto; >15. Este procedimiento revela 22 genes conocidos para ser objetivos miR-21 potenciales, de los cuales 8 se mostraron previamente para expresarse dentro del tejido del corazón en función de su perfil de expresión GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (ver Tabla 1). 5 genes se predijeron adicionalmente como objetivos miR-21 usando la base de datos miARN PicTar 9 (Krek *et al.*, 2005) (<http://pictar.bio.nyu.edu/>). Usando el software de predicción objetivo miARN TargetScan (Whitehead Institute for Biomedical Research, EE. UU., versión 4.0; julio 2007; <http://www.targetscan.org/>) los inventores identifican objetivos con sitios conservados con coincidencias de semillas de 8-mer para miR-21 únicamente para dos objetivos. El Spry1 luego se estudió en más detalle.

Western blotting

Los lisados de la proteína de corazones explantados o fibroblastos/cardiomiocitos cultivados se prepararon como se describe (Buitrago *et al.*, 2005). Los extractos (20-50 μ g de proteína por línea) se mezclaron con solución amortiguadora de carga de muestra y en condiciones reducidas se separaron en geles de SDS-poliacrilamida al 10%. Las proteínas se electrotransfirieron en la membrana PVDF (Immun-Blot[®], Bio-Rad). Las bandas se detectaron usando un ensayo de quimioluminiscencia (ECL Plus, Amersham). Los inventores usan anticuerpos primarios contra sprouty-1 (Santa Cruz, sc-30048, dilución 1:250-1:500), Erk1/2 (señalización celular, #9102, dilución 1:1000); fosfo-Erk1/2 (señalización celular, #9101, dilución 1:1000) y G- β (Santa Cruz Biotechnology, sc-378, dilución 1:1000), así como anticuerpos secundarios apropiados (Anti-ratón-HRP (señalización celular, #7076, dilución 1:10000; Anti-conejo-HRP (señalización celular, #7074, dilución 1:10000).

Modelo TAC in vivo y administración de oligonucleótido modificado

Los inventores usan ratones C57BL/6 macho (10-12 semanas de edad, 25g) de Charles River Laboratories (Sulzfeld, Alemania). La constricción transaórtica (TAC) se creó usando una sutura 7-0 atada dos veces alrededor de la aorta y una aguja de calibre 27. La aguja luego se retiró suavemente, proporcionando una constricción de alrededor de 80% de la aorta. Durante las mismas operaciones, se implantó un catéter en la vena yugular por procedimientos de cirugía estándares. Las secuencias fueron: antagomir-21, 5'-oUsoCsoAoAoCoAoUoCoAoGoUoCoUoGoUoAoAoGsoCsoUsoAs-Chol-3'. Todos los nucleótidos usados en la síntesis son 2'-OMe-modificados (Subíndice O'). El subíndice 's' representa una ligadura de fosforotioato; "Cy3" indica etiqueta de pigmento Cy3 en el extremo 5' del oligo; "Chol" representa colesterol ligado a través de una ligadura de hidroxiprolinol. El tratamiento se inicia 24h después del TAC y los animales reciben PBS o inyecciones del antagonista miR-21 por medio de un catéter de la vena yugular implantado (tres días consecutivos), inyecciones de la vena yugular de PBS o antagonista miR-21 en dosis de 80 mg por kg de peso corporal en 0.2 ml por inyección. Como un control positivo para el suministro cardiaco efectivo el oligonucleótido modificado etiquetado Cy-3 (antagomir-181 a) (80 mg/kg) se inyectó en el catéter de la vena yugular y el corazón se extrajo 3 h después, se fijó y la tinción de Cy3 se observó por microscopia de fluorescencia.

Análisis funcional cardiaco

Después de 3 semanas de TAC, los ratones se anestesiaron con isoflurano, y las dimensiones y función cardiacas se analizaron por ecocardiografía Doppler de 15-MHz pulso-onda. Luego el corazón se extrajo, se pesó después de la extracción de la aurícula y se sometió a análisis adicional. Los estudios de la ecocardiografía se realizaron con anestesia suave con respiración espontánea usando isoflurano. Dos ultrasonógrafos independientes experimentados en la obtención de imágenes de roedores y con ocultación respecto a los grupos experimentales realizaron la ecocardiografía, operando una Toshiba Power Vision 6000 con un transductor 15 MHz. Las vistas de los ejes cortos parasternales de la izquierda en 2D en el nivel de los músculos papilares se registraron. La colocación de la sonda correcta se valoró por la apariencia redonda de la cavidad ventricular izquierda (LV) después del angulado y movimientos transductores craneocaudales. El área diastólica del extremo LV se calculó por rastros manuales del límite endocárdico después de la planimetría con el paquete de software Nice (Toshiba Medical Systems). Se registraron los rastros en modo M transversales simultáneos con el cursor colocado en la mitad de la cavidad LV. El acortamiento fraccionado se calculó como se describe (Collins *et al.*, 2001).

Detección de fibrosis cardiaca

Los corazones de ratones se fijaron en formalina de solución amortiguadora al 4% y enterraron en parafina. Se examinaron secciones de 5 µm de rojo picrosirio usando un microscopio Nikon ECLIPSE 50i equipado con filtros para proporcionar iluminación polarizada de forma circular (Whittaker *et al.*, 1994). El filtro inferior se colocó por encima del anillo del diafragma del iris del campo de microscopio, mientras que el filtro superior se construyó de una combinación de una placa de cuarto de onda colocada debajo del polarizado lineal alineado de tal manera que su eje de transmisión fue de 45° para el eje rápido de la placa de onda. Estos dos filtros se cruzaron, es decir, se alinearon de manera que el respaldo en el campo de visión fuese tan oscuro como fuera posible. Las imágenes del tejido se obtuvieron con los lentes objetivos 20X, se registraron en una cámara digital enfriada (DS-5Mc, Nikon), y se analizaron usando el software de análisis de imagen SigmaScan Pro 5.0 (SPSS Inc., EE. UU.). Precisamente, las imágenes originales (polarizadas circularmente), se resolvieron cada una en sus componentes cian, amarillo, magenta y negro (usando la función automatizada CYMK proporcionada por el análisis de imagen). El componente negro se sustrajo de la imagen polarizada. Antes de la sustracción el componente negro se ajustó a la claridad adecuadamente para asegurar la eliminación del espacio intersticial y los elementos sin colágeno pero no de las fibras de colágeno más delgadas (confirmado por inspección). Luego la imagen sustraída se sometió a una separación de color final en sus componentes de tono, saturación, valor (HSV, por sus siglas en inglés) usando la función automatizada HSV proporcionada por el software de imágenes. Un histograma de la frecuencia de tono se obtuvo de la imagen del tono de 8 bits resuelta, que contiene 256 colores. Las siguientes definiciones de tono se usaron: rojo 2-9 y 230-256, naranja 10-38, amarillo 39-51, verde 52-128. El intervalo de tono 129-229 consiste en espacio intersticial y elementos del tejido no birrefringentes. El número de píxeles dentro de los intervalos del tono rojo, naranja, amarillo y verde se determinó, y expresó como un porcentaje del número total de píxeles de colágeno, que a su vez se expresó como un porcentaje del número total de píxeles en la imagen.

Apoptosis de fibroblastos y producción de FGF-2

Los fibroblastos cardiacos obtenidos por la etapa de preformación de placa durante el aislamiento del cardiomiocito se cultivaron hasta la subconfluencia. La pureza celular fue >95% en función de la tinción con el marcador de fibroblasto prolif-4-hidroxilasa antirrata (Acris Antibodies, AF5110-1; datos no mostrados). Después del tratamiento con precursores miR-21, inhibidores o controles respectivos (ver arriba), los fibroblastos positivos de Anexina V se midieron por análisis FACS (kit Annexin-VFLUOS, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). El ensayo inmunosorbente ligado a la enzima (ELISA) se realizó para cuantificar las concentraciones de FGF-2 en los sobrenadantes de fibroblastos cardiacos modulados por miR-21. La determinación FGF-2 se llevó a cabo usando el kit de Inmunoensayo Básico Quantikine FGF (R&D Systems, Minneapolis, EE. UU.) de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Referencias

- Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350-355 (2004).
- 5 Buitrago, M. *et al.* The transcriptional repressor Nab1 is a specific regulator of pathological cardiac hypertrophy. *Nat Med* 11, 837-844 (2005).
- Care, A. *et al.* MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 13, 613-618 (2007).
- Casci.T., Vinos, J. & Freeman, M. Sprouty, an Intracellular Inhibitor of Ras Signaling. *Cell* 96, 655-665 (1999).
- Castoldi, M. *et al.* A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA* 12, 913-920 (2006).
- 10 Collins, K. A. *et al.* Accuracy of echocardiographic estimates of left ventricular mass in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H1954-H1962 (2001).
- Engelhardt, S., Hein, L., Wiesmann, F. & Lohse, M.J. Progressive hypertrophy and heart failure in beta 1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 7059-7064 (1999).
- 15 Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A. & Enright, A.J. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research* 34,D140-D144 (2006).
- Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T. & Nishida, E. Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol* 4, 850-858 (2002).
- Iorio, M.V. *et al.* MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. *Cancer Res* 65, 7065-7070 (2005).
- Kruetzfeldt J, *et al.* Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'. *Nature* 438, 685-689 (2005).
- 20 Lu, J. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834-838 (2005).
- Merkle, S. *et al.* A Role for Caspase-1 in Heart Failure. *Circ Res* 100, 645-653 (2007).
- Mi, S. *et al.* MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 19971-19976 (2007).
- 25 Rottbauer, W. *et al.* VEGF-PLC{gamma}1 pathway controls cardiac contractility in the embryonic heart. *Genes Dev.* 19, 1624-1634 (2005).
- Thum, T. & Borlak, J. Mechanistic role of cytochrome P450 monooxygenases in oxidized low-density lipoprotein-induced vascular injury: therapy through LOX-1 receptor antagonism? *Circ Res* 94, e1-13 (2004).
- Thum, T. *et al.* MicroRNAs in the Human Heart: A Clue to Fetal Gene Reprogramming in Heart Failure. *Circulation* 116, 258-267 (2007).
- 30 Yang, B. *et al.* The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med* 13, 486-491 (2007).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Julius-Maximilians-Universität Würzburg
 <120> Microácido ribonucleico (miARN) y objetivos cadena abajo
 <130> U30038
 <160> 12
 <170> Patent In versión 3.3
 <210> 1
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> microARN-21
 <400> 1
 uagcuuauca gacugauguu ga 22
 <210> 2
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> región promotora de miR-21
 <400> 2
 ttggataagg atgacgcaca gattgtccta ataaggactt agatt 45
 <210> 3
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> región promotora de miR-21 con delección del sitio de unión de CREB
 <400> 3
 gattgtccta ataaggactt agatt 25
 <210> 4
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> región promotora de miR-21 con delección del sitio de unión
 de CREB y mutación puntual del sitio de unión de SRF
 <400> 4
 gattgtccta aacaaaactt agatt 25
 <210> 5
 <211> 23

ES 2 436 885 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> oligo antisentido de morfolino contra dre-mirR-21 maduro

<400> 5
 gccaacacca gtctgataag cta 23

<210> 6
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> oligo antisentido de morfolino bloqueado múltiple para interferir con mirR-21

<400> 6
 tgtaacagcc aacaccagtc tgataagcta t 31

<210> 7
 <211> 960
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 atggatcccc aaaatcaaca tggcagtggc agttcgttag ttgtgatcca gcagccttct 60
 ttggatagcc gtcagagatt agactatgag agagagattc agcctactgc tattttgtcc 120
 ttagaccaga tcaaggccat aagaggcagc aatgaataca cagaagggcc ttcggtggg 180
 aaaagacctg ctccctcggac agcaccaaga caagaaaagc atgaaaggac tcatgaaatc 240
 ataccaatta atgtgaataa taactacgag cacagacaca caagccacct gggacatgca 300
 gtactcccaa gtaatgccag gggccccatt ttgagcagat caaccagcac tggaagtgca 360
 gccagctctg ggagcaacag cagtgcctct tctgaacagg gactgtagg aaggtcacca 420
 ccaaccagac cagtcctctg tcataggtct gaaagggcaa tccggacca gcccaagcaa 480
 ctgattgtgg atgacttgaa gggttccttg aaagaggacc tgacacagca caagttcatt 540
 tgtgaacagt gtgggaagtg caagtgtgga gaatgcactg ctcccaggac cctaccatcc 600
 tgtttggcct gtaaccggca gtgcctttgc tctgctgaga gcatggtgga atatggaacc 660
 tgcatgtgct tagtcaaggg catcttctac cactgctcca atgacgacga aggggattcc 720
 tattcagata atccttgctc ctgttcacaa tcacactgct gctctagata cctgtgtatg 780
 ggagccatgt ctttattttt accttgctta ctctgttato ctectgetaa aggatgcctg 840
 aagctgtgca ggagggtgta tgactggatc catcgcccag ggtgcagatg taagaactcc 900
 aacactgtct attgtaagct ggagagctgc ccctcccggg gtcagggtaa accatcatga 960

<210> 8

ES 2 436 885 T3

<211> 319
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Met Asp Pro Gln Asn Gln His Gly Ser Gly Ser Ser Leu Val Val Ile
 1 5 10 15

Gln Gln Pro Ser Leu Asp Ser Arg Gln Arg Leu Asp Tyr Glu Arg Glu
 20 25 30

Ile Gln Pro Thr Ala Ile Leu Ser Leu Asp Gln Ile Lys Ala Ile Arg
 35 40 45

Gly Ser Asn Glu Tyr Thr Glu Gly Pro Ser Val Val Lys Arg Pro Ala
 50 55 60

Pro Arg Thr Ala Pro Arg Gln Glu Lys His Glu Arg Thr His Glu Ile
 65 70 75 80

Ile Pro Ile Asn Val Asn Asn Asn Tyr Glu His Arg His Thr Ser His
 85 90 95

Leu Gly His Ala Val Leu Pro Ser Asn Ala Arg Gly Pro Ile Leu Ser
 100 105 110

Arg Ser Thr Ser Thr Gly Ser Ala Ala Ser Ser Gly Ser Asn Ser Ser
 115 120 125

Ala Ser Ser Glu Gln Gly Leu Leu Gly Arg Ser Pro Pro Thr Arg Pro
 130 135 140

Val Pro Gly His Arg Ser Glu Arg Ala Ile Arg Thr Gln Pro Lys Gln
 145 150 155 160

Leu Ile Val Asp Asp Leu Lys Gly Ser Leu Lys Glu Asp Leu Thr Gln
 165 170 175

His Lys Phe Ile Cys Glu Gln Cys Gly Lys Cys Lys Cys Gly Glu Cys
 180 185 190

Thr Ala Pro Arg Thr Leu Pro Ser Cys Leu Ala Cys Asn Arg Gln Cys
 195 200 205

Leu Cys Ser Ala Glu Ser Met Val Glu Tyr Gly Thr Cys Met Cys Leu
 210 215 220

Val Lys Gly Ile Phe Tyr His Cys Ser Asn Asp Asp Glu Gly Asp Ser

<220>

<223> oligonucleótido antisentido contra miR-21

<400> 12

ucaacaucag ucugauaagc ua

22

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 a 30 nucleósidos ligados, en donde el oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase complementaria a miR-21 o un precursor del mismo, para uso en el tratamiento, prevención o diagnóstico de fibrosis en un sujeto.
2. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en donde
- (i) la fibrosis es fibrosis del hígado, fibrosis cardíaca, fibrosis del riñón, fibrosis del pulmón, fibrosis de la piel, fibrosis relacionada con la edad o fibrosis del bazo; y/o en donde
- 10 (ii) dicho sujeto tiene al menos una enfermedad o afección seleccionada de una enfermedad o afección cardíaca, una enfermedad o afección hepática y una enfermedad o afección pulmonar.
3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2 para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho tratamiento o prevención además comprende la administración de uno o más agentes farmacéuticos adicionales.
4. El compuesto de la reivindicación 2 para el uso de la reivindicación 2, en donde la enfermedad o afección cardíaca se selecciona del grupo que consiste en hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca por hipertensión, insuficiencia cardíaca diastólica, insuficiencia cardíaca sistólica, enfermedad de almacenaje relacionada con el corazón, cardiomiopatía, pericarditis constrictiva, enfermedad de la arteria coronaria, infarto de miocardio agudo, infarto de miocardio crónico, insuficiencia cardíaca derecha, arritmias cardíacas, fibrosis relacionada con miocarditis, y enfermedad de la válvula cardíaca, o en donde la al menos una enfermedad o afección hepática es lesión hepática crónica, infección por virus de hepatitis, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis o en donde la al menos otra enfermedad o afección pulmonar es enfermedad pulmonar obstructiva crónica o fibrosis pulmonar idiopática.
- 15 20
5. El compuesto de la reivindicación 1 para el uso de la reivindicación 1, donde el sujeto tiene al menos otra enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en hipertensión pulmonar, una enfermedad relacionada con los vasos sanguíneos, esclerosis por gota, fibrosis retroperitoneal, fibrosis proliferativa, fibrosis neoplástica, fibrosis sistémica nefrogénica, fibrosis por inyección, fibrosis mediastínica, mielofibrosis, síndrome de dolor posterior a la vasectomía, artritis reumatoide.
- 25
6. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para el uso de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la administración del compuesto al sujeto
- a. mejora la fibrosis;
- b. hace más lento el progreso adicional de la fibrosis;
- 30 c. detiene el progreso adicional de la fibrosis;
- d. reduce la fibrosis y/o
- e. reduce el contenido de colágeno.
7. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 a 30 nucleósidos ligados, en donde la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es complementaria a un miR-21 o a un precursor del mismo, para uso en el tratamiento de un trastorno fibroproliferativo.
- 35
8. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde el oligonucleótido modificado consiste en de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleósidos ligados y/o la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado tiene por lo menos 15, por lo menos 16, por lo menos 17, por lo menos 18, por lo menos 19, por lo menos 20, por lo menos 21 o por lo menos 22 nucleobases contiguas de la secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 12, y/o en donde la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado tiene no más de dos alineaciones erróneas para la secuencia de nucleobase de miR-21 o un precursor del mismo.
- 40
9. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el compuesto comprende un oligonucleótido modificado conjugado a un ligando, y en donde el ligando es opcionalmente colesterol.
- 45
10. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el al menos una ligadura internucleósido es una ligadura internucleósido modificada, o en donde cada ligadura internucleósido es una ligadura internucleósido modificada, en donde opcionalmente dicha al menos una, o cada ligadura internucleósido modificada es una ligadura internucleósido fosforotioato.
- 50
11. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde cada uno de una pluralidad de nucleósidos comprende un azúcar modificado, o en donde cada nucleósido comprende un azúcar modificado; en donde opcionalmente cada una de dichas pluralidades de azúcares modificados, o cada uno de dichos azúcares modificados, se selecciona independientemente de azúcar 2'-O-metoxietilo, un azúcar 2'-fluoro, un azúcar 2'-O-metilo o una porción de azúcar bicíclica.

12. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde por lo menos un nucleósido comprende una nucleobase modificada, y en donde la nucleobase modificada opcionalmente es una 5-metil citosina.

5 13. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es al menos 90% complementaria, es al menos 95% complementaria, o es 100% complementaria a la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO:1.

14. Un método *in vitro* para la diagnosis de la fibrosis que comprende los pasos de:

a. proporcionar una muestra obtenida de un paciente que se supone que padece de fibrosis;

10 b. medir la expresión de miR-21;

en donde un nivel elevado de miR-21 en comparación con una muestra de control indica fibrosis o una predisposición a la misma.

15. Un método *in vitro* para cribado de un compuesto farmacéuticamente activo para el tratamiento y/o prevención de fibrosis o una predisposición de la misma, que comprende las etapas de:

15 a. proporcionar una muestra que contenga miR-21;

b. poner en contacto una sustancia candidata con la muestra;

c. determinar el efecto de la sustancia candidata sobre la muestra;

en donde una alteración de miR-21 indica un compuesto farmacéuticamente activo.

Figura 1a

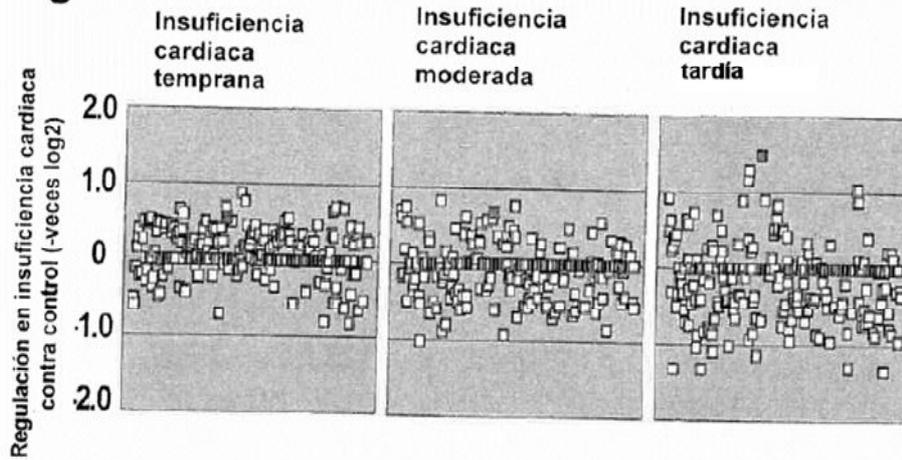


Figura 1b

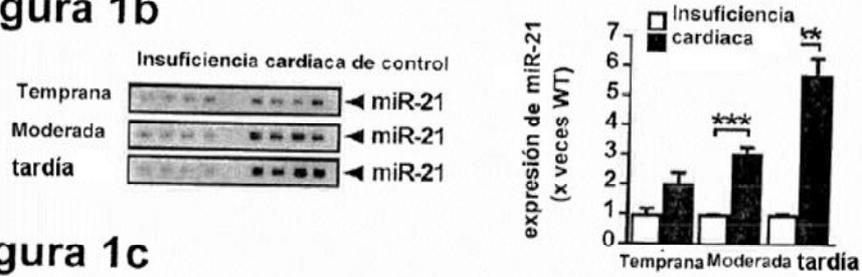


Figura 1c

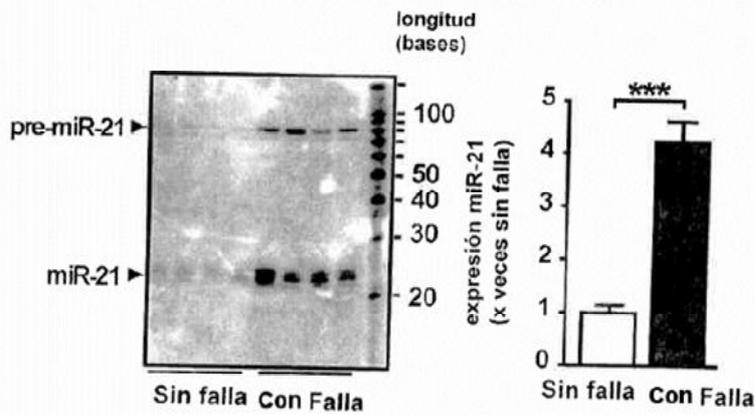


Figura 1d

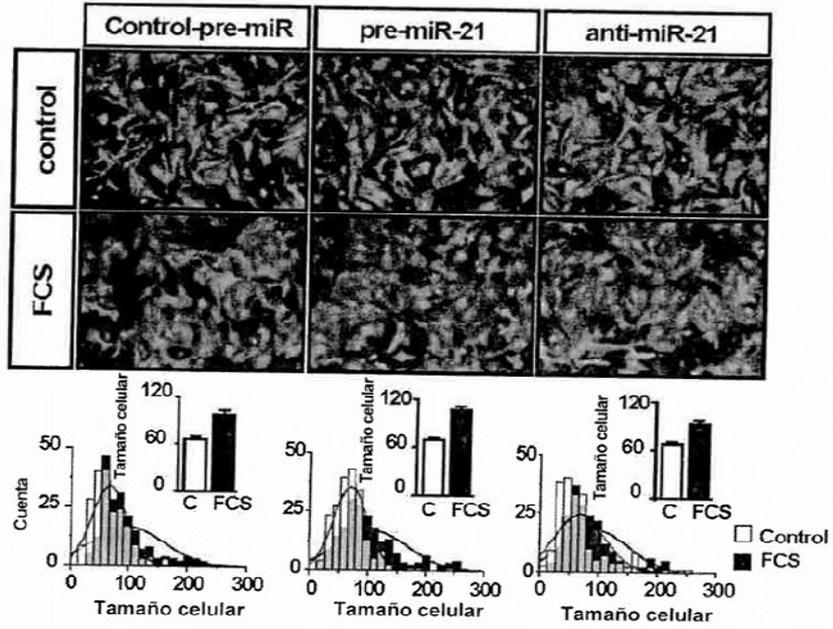


Figura 1e

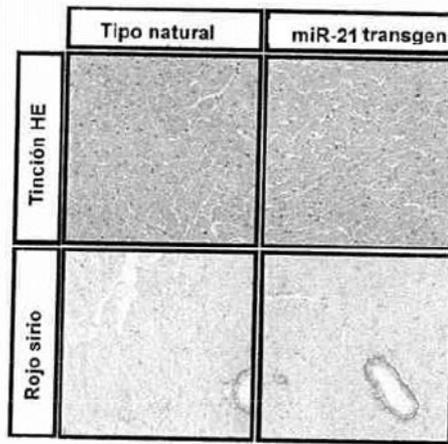
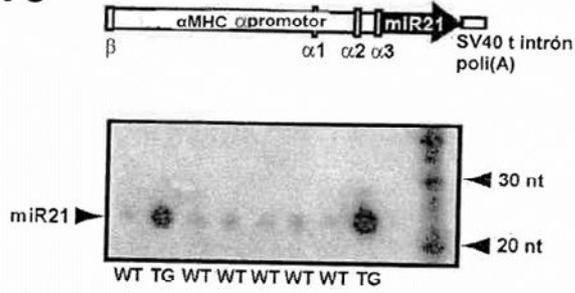


Figura 1f

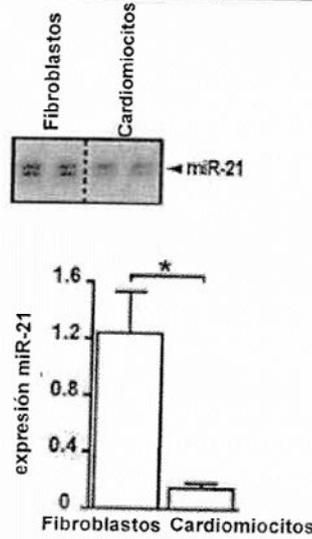


Figura 2a

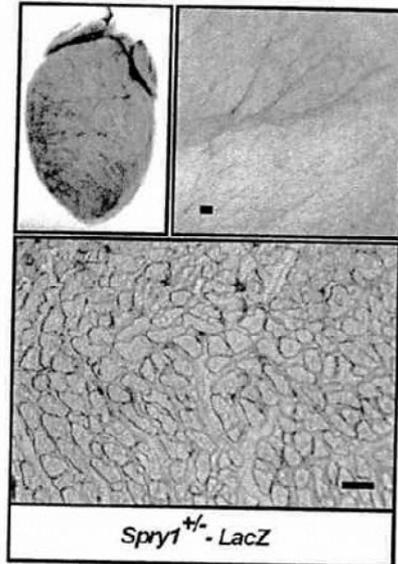


Figura 2b

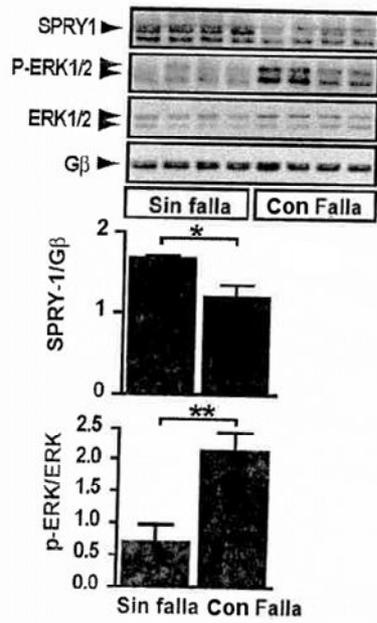


Figura 2c

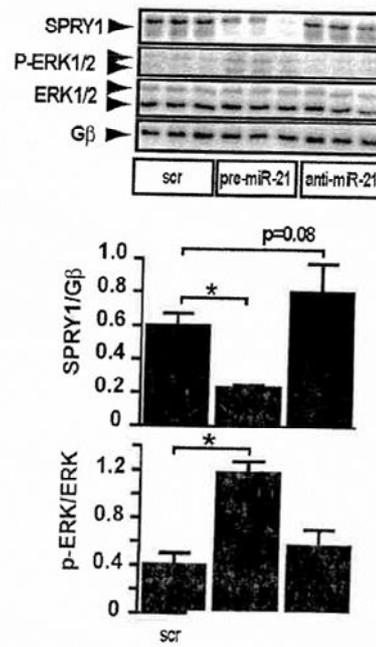


Figura 2d

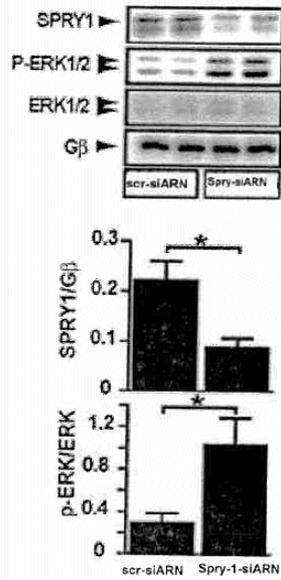


Figura 2e

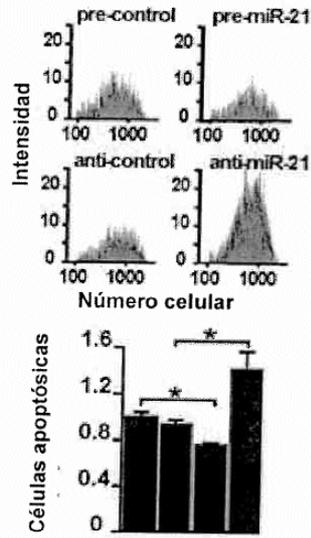


Figura 2f

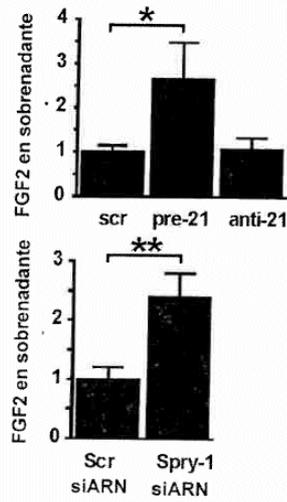


Figura 3a

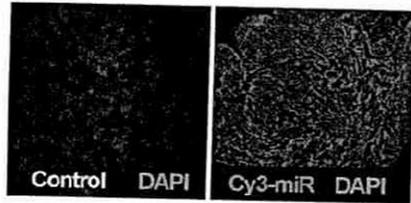


Figura 3b

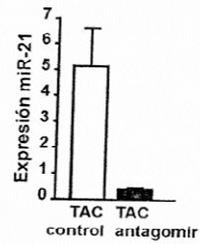
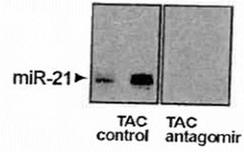


Figura 3c

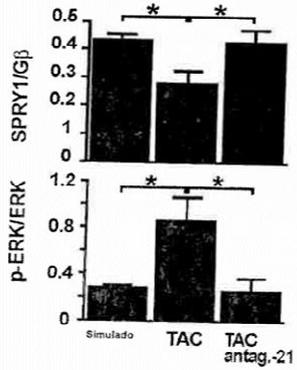
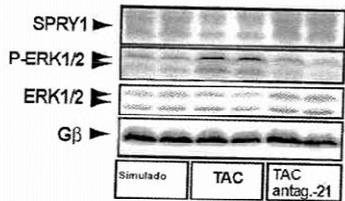


Figura 3d

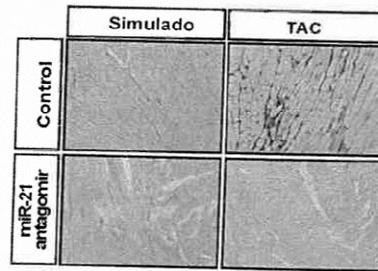


Figura 3e

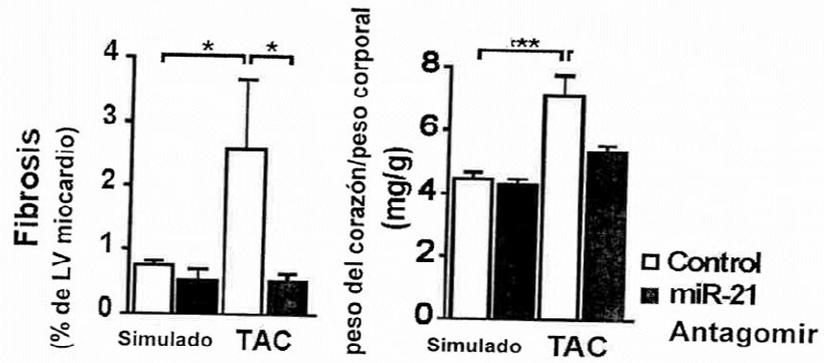


Figura 3f

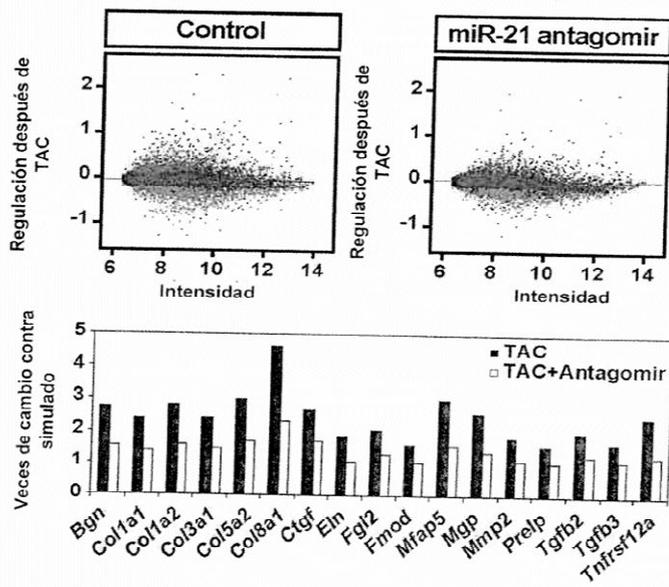


Figura 3g

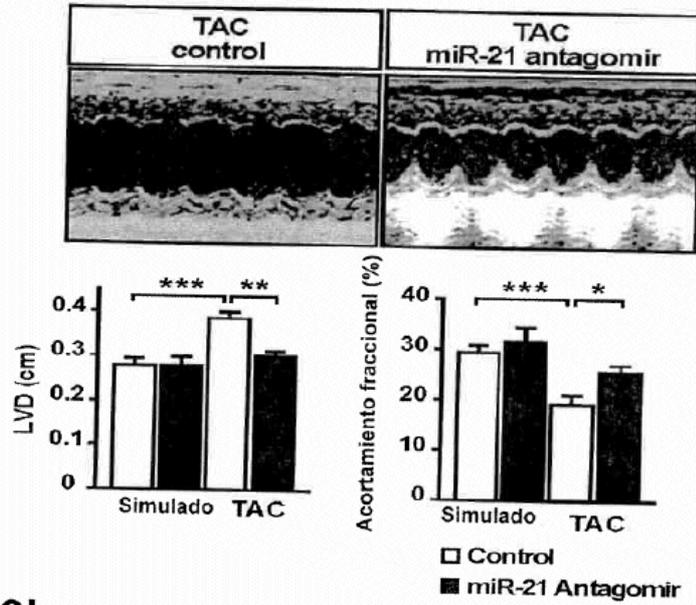


Figura 3h

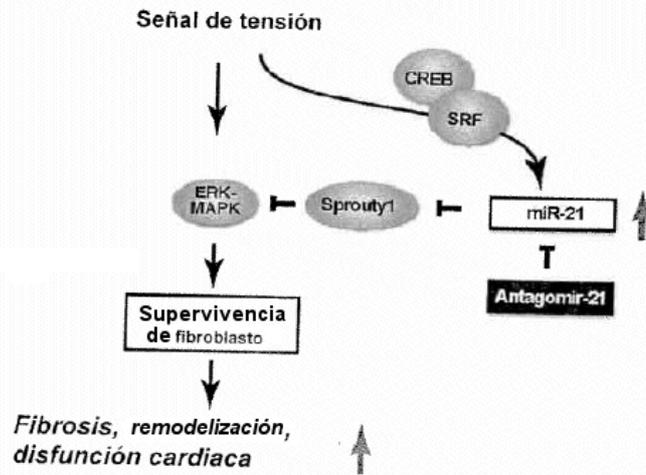


Figura 4a

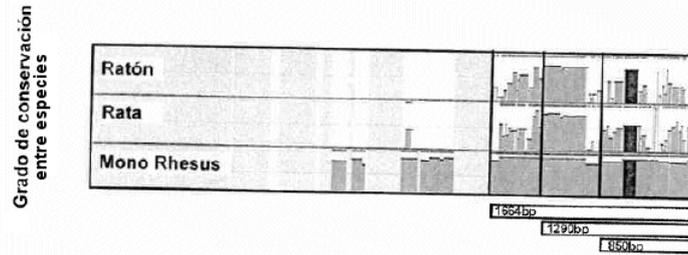


Figura 4b

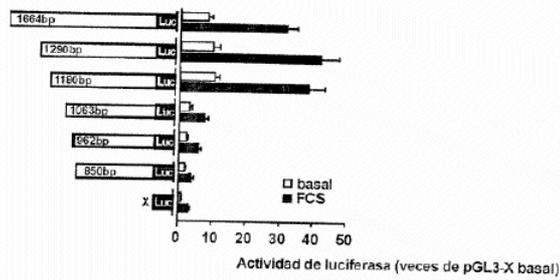


Figura 4c

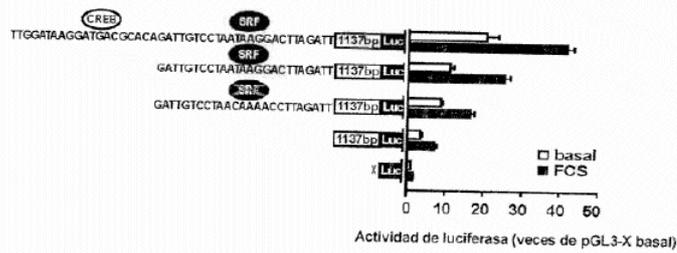


Figura 5a

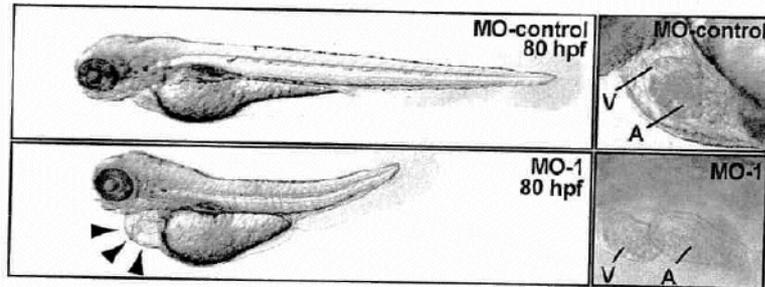


Figura 5b

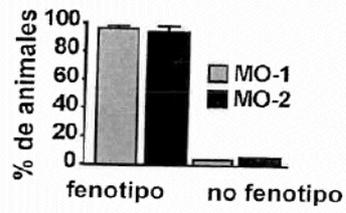


Figura 5c

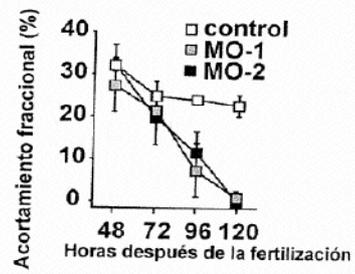


Figura 6a

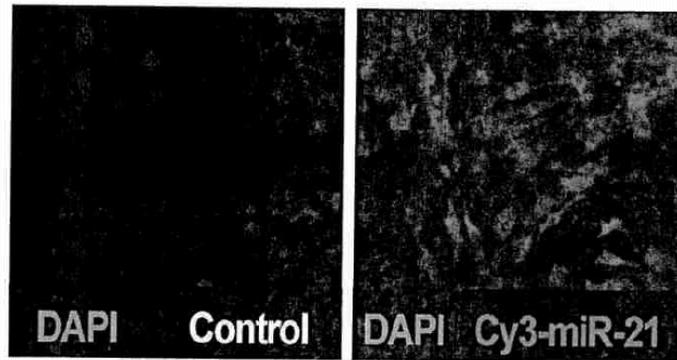
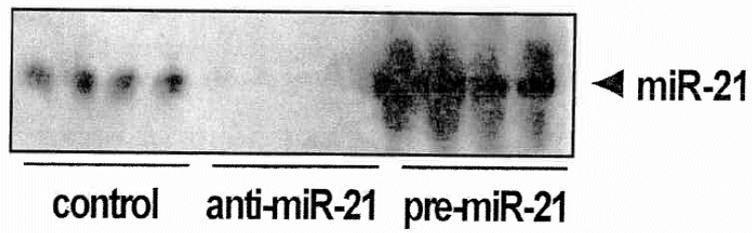


Figura 6b



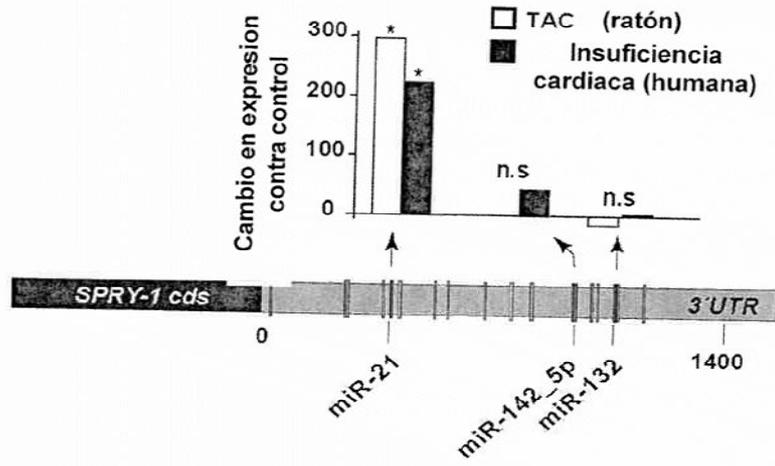


Figura 7

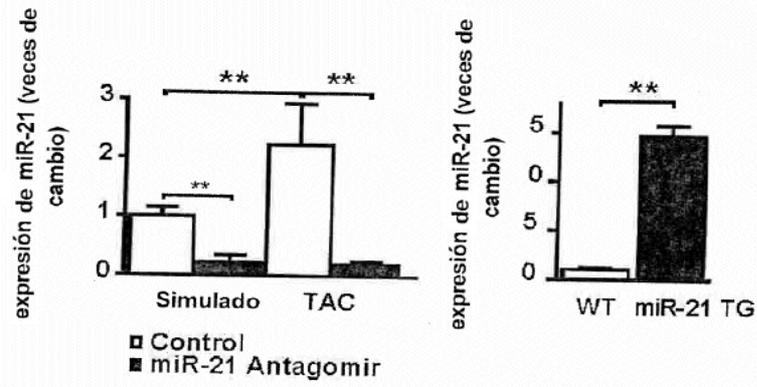


Figura 8