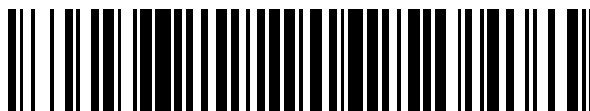


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 174**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2013 PCT/US2013/063884**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.04.2014 WO14058881**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2013 E 13777458 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 2906698**

54 Título: **Métodos de tratamiento de Síndrome de Alport**

30 Prioridad:

09.10.2012 US 201261711514 P
13.03.2013 US 201361779137 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
07.04.2020

73 Titular/es:

SANOFI (100.0%)
54, rue La Boétie
75008 Paris , FR

72 Inventor/es:

DUFFIELD, JEREMY;
BHAT, BALKRISHEN y
MACKENNA, DEIDRE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 753 174 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

Métodos de tratamiento de Síndrome de Alport

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] El presente documento proporciona un oligonucleótido modificado para usar en un método para el tratamiento del Síndrome de Alport.

10 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

[0002] El colágeno tipo IV, un componente principal de la membrana basal, es una familia de seis cadenas alfa: colágeno alfa-1 (tipo IV), colágeno alfa-2 (tipo IV), colágeno alfa-3 (Tipo IV), colágeno alfa-4 (Tipo IV), colágeno alfa-5 (Tipo IV) y colágeno alfa-6 (Tipo IV). Las cadenas alfa-3, alfa-4 y alfa-6 del colágeno IV son componentes fundamentales de la red de colágeno de la membrana basal glomerular (GBM), que realiza la función crítica de filtración de sangre por el riñón.

[0003] El síndrome de Alport es una forma hereditaria de enfermedad renal en la que se produce un tipo anormal de membrana basal glomerular (GBM), que conduce a fibrosis intersticial, esclerosis glomerular y eventual pérdida de la función renal. La enfermedad también se caracteriza frecuentemente por defectos auditivos y anomalías oculares. El síndrome de Alport es causado por una mutación en *Col4a3*, *Col4a4* o *Col4a5*, que codifican las cadenas alfa3 (IV), alfa4 (IV) y alfa5 (IV) de colágeno tipo IV, respectivamente. Las mutaciones en el gen *Col4a5* en el cromosoma X causan la forma ligada al X del síndrome de Alport, que representa el 85% de todos los casos de la enfermedad. Una forma autosómica recesiva se debe a la herencia de mutaciones en cada copia de *Col4a3* o *Col4a4*, cada una de las cuales se encuentra en el cromosoma 2. La rara forma autosómica dominante se debe a la herencia de una mutación dominante negativa en el gen *Col4a3* o *Col4a4*. La forma ligada al cromosoma X es más grave en hombres que en mujeres, y la mayoría de los casos en hombres progresan a enfermedad renal en etapa terminal (ESRD). La forma autosómica es de gravedad similar en hombres y mujeres. La mayoría de los casos de la enfermedad se deben a una mutación hereditaria, pero algunos casos se deben a una mutación de novo en uno de los genes *Col4aA*.

[0004] Noone et al. (Pediatric Nephrology, 2013, 28: 7, páginas 1025-1036) es una revisión de los mecanismos del síndrome de Alport y las posibles estrategias terapéuticas para el tratamiento de la progresión de la enfermedad del síndrome de Alport.

[0005] Zhong y col. (Journal of the American Society of Nephrology, 2011, 22: 9, páginas 1668-1681) enseña que la señalización Smad3 aumenta la expresión de miR-21, que promueve la fibrosis renal, y sugiere que la inhibición de miR-21 puede ser un enfoque terapéutico para suprimir la fibrosis renal.

40 RESUMEN DE LA INVENCION

[0006] La presente invención proporciona un oligonucleótido modificado que consta de 12 a 25 nucleósidos enlazados, para su uso en un método para tratar el síndrome de Alport comprende administrar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene el síndrome de Alport el oligonucleótido modificado, en el que la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es complementario a miR-21. En ciertas realizaciones, el sujeto ha sido diagnosticado con Síndrome de Alport antes de administrar el oligonucleótido modificado. En ciertas realizaciones, se determinó que el sujeto, antes de la administración del oligonucleótido modificado, tenía un nivel aumentado de miR-21 en el tejido renal del sujeto. En ciertas realizaciones, se determinó que el sujeto, antes de la administración del oligonucleótido modificado, tenía un nivel aumentado de miR-21 en la orina o la sangre del sujeto.

[0007] En cualquiera de las realizaciones proporcionadas en este documento, la administración de un oligonucleótido modificado complementario a miR-21, a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene el síndrome de Alport, puede mejorar la función del riñón; retrasar la aparición de enfermedad renal en etapa terminal; retrasar el tiempo de diálisis; retrasar el tiempo de trasplante renal; y/o mejorar la esperanza de vida en el tema.

[0008] En cualquiera de las realizaciones proporcionadas en este documento, la administración de un oligonucleótido modificado complementario a miR-21, a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene el síndrome de Alport puede reducir hematuria; retrasar la aparición de hematuria; reducir la proteinuria; retrasar la aparición de proteinuria; reducir la fibrosis renal; lento avance de la fibrosis; y/o detener la progresión adicional de la fibrosis.

[0009] En cualquiera de las realizaciones proporcionadas en este documento, el sujeto puede tener una mutación seleccionada de una mutación en el gen que codifica la cadena alfa 3 del colágeno de tipo IV, una mutación en el gen que codifica la cadena alfa 4 de tipo IV de colágeno, o una mutación en el gen que codifica la cadena alfa 5 del colágeno tipo IV. En ciertas realizaciones, el sujeto es masculino. En ciertas realizaciones, el sujeto es femenino. En ciertas realizaciones, el sujeto se identifica como que tiene hematuria y/o proteinuria. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene una función renal reducida. En ciertas realizaciones, el sujeto necesita una función renal mejorada.

[0010] Cualquiera de las realizaciones proporcionadas en este documento puede comprender la medición de nitrógeno ureico en sangre en la sangre del sujeto; medir la creatinina en la sangre del sujeto; medir el aclaramiento de creatinina en el sujeto; medir proteinuria en el sujeto; medición de la relación albúmina: creatinina en el sujeto; y/o medir la tasa de filtración glomerular en el sujeto.

[0011] Cualquiera de las realizaciones proporcionadas en el presente documento puede comprender medir la proteína N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG) en la orina del sujeto; medir la proteína lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) en la orina del sujeto; medir la proteína de la molécula 1 de lesión renal (KIM-1) en la orina del sujeto; medición de la proteína interleucina-18 (IL-18) en la orina del sujeto; medir los niveles de proteína quimioatrayente de monocitos (MCP1) en la orina del sujeto; medir los niveles del factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) en la orina del sujeto; medir fragmentos de colágeno IV (Col IV) en la orina del sujeto; medir fragmentos de colágeno III (Col III) en la orina del sujeto; y/o medir los niveles de proteína de podocitos en la orina del sujeto, en donde la proteína de podocitos se selecciona de nefrina y podocina. Cualquiera de las realizaciones proporcionadas en el presente documento puede comprender medir la proteína cistatina Cen la sangre de un sujeto; medir la proteína de traza β (BTP) en la sangre de un sujeto; y medir 2-microglobulina (B2M) en la sangre de un sujeto.

[0012] Cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento puede mejorar uno o más marcadores de la función renal en el sujeto, seleccionados de nitrógeno de urea en sangre reducido en el sujeto; creatinina reducida en la sangre del sujeto; aclaramiento de creatinina mejorado en el sujeto; proteinuria reducida en el sujeto; relación reducida de albúmina: creatinina en el sujeto; y/o tasa de filtración glomerular mejorada en el sujeto. Cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento puede mejorar uno o más marcadores de la función renal en el sujeto, seleccionados de NAG reducido en la orina del sujeto; NGAL reducido en la orina del sujeto; KIM-1 reducido en la orina del sujeto; IL-18 reducida en la orina del sujeto; MCP1 reducido en la orina del sujeto; CTGF reducido en la orina del sujeto; fragmentos reducidos de colágeno IV en la orina del sujeto; fragmentos reducidos de colágeno III en la orina del sujeto; y niveles reducidos de proteína de podocitos en la orina del sujeto, en donde la proteína de podocitos se selecciona de nefrina y podocina. Cualquiera de los métodos proporcionados en este documento pueden mejorar uno o más marcadores de la función renal seleccionados de reducida proteína cistatina Cen la sangre de un sujeto, proteína traza β reducida (BTP) en la sangre de un sujeto, y la reducción de 2-microglobulina (B2M) en la sangre de un sujeto.

[0013] En cualquiera de las realizaciones proporcionadas en este documento, la proteinuria es albuminuria. La albuminuria puede ser albuminuria normal alta, microalbuminuria o macroalbuminuria.

[0014] En ciertas realizaciones, el síndrome de Alport es la forma ligada al cromosoma X del síndrome de Alport. En ciertas realizaciones, el Síndrome de Alport es la forma autosómica del Síndrome de Alport.

[0015] Cualquiera de las realizaciones proporcionadas en este documento pueden comprender la administración de al menos una terapia adicional seleccionada a partir de una angiotensina II enzima convertidora de inhibidor (ACE), un bloqueador del receptor de angiotensina II (ARB), un agente anti-hipertensivo, un análogo de vitamina D, un aglutinante de fosfato oral, diálisis y trasplante de riñón. En cualquiera de estas realizaciones, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II (ACE) se seleccionan de captopril, enalapril, lisinopril, benazepril, quinapril, fosinopril y ramipril. En cualquiera de estas realizaciones, los bloqueadores del receptor de angiotensina II (ARB) se seleccionan de candesartán, irbesartán, olmesartán, losartán, valsartán, telmisartán y eprosartán. En cualquiera de estas realizaciones, un inhibidor de la ECA se selecciona de cilazapril, perindopril y trandolapril.

[0016] En ciertas realizaciones, un inhibidor de ACE se administra a una dosis que varía de 0,5 a 1 mg/m²/día, de 1 a 6 mg/m²/día, desde 1 a 2 mg/m²/día, desde 2 a 4 mg/m²/día, o de 4 a 8 mg/m²/día.

[0017] En ciertas realizaciones, se administra un ARB a una dosis que varía de 6,25 a 150 mg/m²/día. En cualquiera de estas realizaciones, se administra un ARB a una dosis de 6,25 mg/m²/día, 10 mg/m²/día, 12,5 mg/m²/día, 18,75 mg/m²/día, 37,5 mg/m²/día, 50 mg/m²/día, o 150 mg/m²/día.

[0018] En ciertas realizaciones, la al menos una terapia adicional es un antagonista de aldosterona. En ciertas formas de realización, un antagonista de la aldosterona es la espironolactona. En ciertas realizaciones, la espironolactona se administra a una dosis que varía de 10 a 35 mg diarios. En ciertas realizaciones, la espironolactona se administra a una dosis de 25 mg diarios.

[0019] En cualquiera de las realizaciones proporcionadas en este documento, la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es al menos 90% complementarias, es al menos 95% complementarias, o es 100% complementaria a la secuencia de nucleobases de miR-21 (SEQ ID NO: 1)

[0020] En cualquiera de las realizaciones proporcionadas en este documento, el oligonucleótido modificado consta de 8 a 30, 12 a 25, o de 15 a 25 nucleósidos enlazados. En cualquiera de las realizaciones proporcionadas en el presente documento, el oligonucleótido modificado consta de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleósidos unidos. En cualquiera de las realizaciones proporcionadas en el presente documento, el oligonucleótido modificado consta de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleósidos unidos.

[0021] En cualquiera de las realizaciones proporcionadas en este documento, el oligonucleótido modificado comprende al menos una modificación de nucleósidos. El nucleósido modificado puede seleccionarse de un nucleósido S-cEt, un nucleósido de 2'-O-metoxietilo y un nucleósido de LNA. El oligonucleótido modificado puede comprender al menos un enlace internucleósido modificado. Cada enlace internucleosídico del oligonucleótido modificado puede ser un enlace internucleósido modificado. En ciertas realizaciones, el enlace internucleosídico modificado es un enlace internucleósido fosforotioato.

[0022] En cualquiera de las realizaciones proporcionadas en este documento, el oligonucleótido modificado puede tener la estructura 5'-AECsATCsAGTCsTGAUsAAGCsTAE-3', (SEQ ID NO: 3) en la que no siguieron nucleósidos por un subíndice indican β -D-deoxiribonucleósidos; los nucleósidos seguidos de un subíndice "E" indican nucleósidos 2'-MOE; los nucleósidos seguidos de un subíndice "S" indican nucleósidos S-cEt, y cada enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico de fosforotioato.

[0023] En el presente documento se describe el uso de un oligonucleótido modificado que consiste en 8 a 30, 12 a 25 o 15 a 25 nucleósidos unidos, en donde la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es complementaria a miR-21, para el tratamiento del síndrome de Alport.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0024]

Figura 1. Anti-miR-21 mejora la función renal de ratones *Col4a3*^{-/-}. Nitrógeno ureico en sangre (BUN) a las 9 semanas (A) y proporción de albúmina/creatinina en orina a las 3, 5, 7 y 9 (B). * indica significación estadística. Figura 2. Anti-miR-21 previene la glomeruloesclerosis en ratones *Col4a3*^{-/-}. La glomeruloesclerosis se evaluó utilizando puntajes de esclerosis semicuantitativa que varían de 0 (sin esclerosis) a 4 (esclerosis completa) (n = 10).

Figura 3. Anti-miR-21 reduce la fibrosis en ratones *Col4a3*^{-/-}. (A) Cuantificación de la fibrosis teñida de rojo de Picrosirius (Sirius) en el riñón (n = 6) y (B) PCR cuantitativa de las transcripciones de *Col1a1* normalizadas a GAPDH (n = 6). * indica significación estadística.

Figura 4. Anti-miR-21 reduce la clasificación de lesión renal en ratones *Col4a3*^{-/-}. (A) Puntuación de rango de lesión renal de secciones renales de ratones de 9 semanas de edad. (B) Proporción de crecientes glomerulares (n = 5). (C) Cuantificación de la lesión del túbulo (n = 5). * indica significación estadística.

Figura 5. Anti-miR-21 reduce la infiltración de macrófagos (A) y disminuye los miofibroblastos (B) en ratones *Col4a3*^{-/-}. (A) Cuantificación de la tinción F4/80 de secciones renales de ratones de 9 semanas de edad (n = 5). (B) Cuantificación de la tinción con α SMA de secciones renales de ratones de 9 semanas de edad (n = 5). * indica significación estadística.

Figura 6. Anti-miR-21 reduce las especies reactivas de oxígeno en ratones *Col4a3*^{-/-}. (A) Cuantificación de peróxido de hidrógeno en orina de ratones *Col4a3*^{-/-} tratados con anti-miR-21 o control PBS (n = 8; * indica significación estadística); (B) Cuantificación de DES en tejido renal de ratones *Col4a3*^{-/-} tratados con control anti-miR-21 o PBS, y en ratones de tipo salvaje (n = 3 por grupo; * indica significación estadística).

Figura 7. Anti-miR-21 mejora el número de podocitos en ratones *Col4a3*^{-/-}. Cuantificación del número de células positivas para WT1 en el glomérulo de ratones *Col4a3*^{-/-} tratados con control anti-miR-21 o PBS (n = 3; p = 0,005).

Figura 8. Anti-miR-21 aumenta la vida útil de los ratones *Col4a3*^{-/-}. (A) Peso de ratones *Col4a3*^{-/-} tratados con control anti-miR-21 o PBS (p < 0,01); (B) Vida útil de ratones *Col4a3*^{-/-} tratados con control anti-miR-21 o PBS (p < 0,001).

Figura 9. Anti-miR-21 mejora la función renal y aumenta la vida útil de los ratones *Col4a3*^{-/-} de una manera sensible a la dosis (n = 10-13 por grupo de tratamiento). (A) Nitrógeno ureico en sangre a las 7 semanas; (B) Vida útil de ratones *Col4a3*^{-/-} tratados con anti-miR-21 en dosis múltiples, una vez por semana (QW) o dos veces por semana (BIW), o control de PBS.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0025] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en las técnicas a las que pertenece la invención. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y técnicas de química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritas en el presente documento son los bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. En el caso de que haya una pluralidad de definiciones para los términos en este documento, prevalecerán las de esta sección. Se pueden usar técnicas estándar para síntesis química, análisis químico, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de sujetos. Ciertas técnicas y procedimientos de este tipo se pueden encontrar, por ejemplo, en "Carbohydrate Modifications in Antisense Research" Editado por Sangvi y Cook, American Chemical Society, Washington DC, 1994; y "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., 18ª edición, 1990. Cuando se hace referencia a una URL u otro identificador o dirección, se entiende que dichos identificadores pueden cambiar e información particular en Internet puede cambiar, pero se puede encontrar información equivalente buscando en

internet. La referencia a la misma evidencia la disponibilidad y difusión pública de dicha información.

[0026] Antes de las presentes composiciones y métodos se describen y se describen, es de entenderse que la terminología usada en este documento es para el propósito de describir solamente realizaciones particulares y no pretende ser limitante. Debe notarse que, como se usa en la especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "ella" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Definiciones

[0027] "Síndrome de Alport" significa una forma hereditaria de la enfermedad renal en donde un nivel anormal de basal glomerular se produce membrana (GBM), que conduce a la fibrosis intersticial, esclerosis glomerular y la eventual pérdida de la función renal. La enfermedad también se caracteriza frecuentemente por defectos auditivos y anomalías oculares.

[0028] "Hematuria" significa la presencia de glóbulos rojos en la orina.

[0029] "Albuminuria" significa la presencia de exceso de albúmina en la orina, e incluye sin limitación, normal, albuminuria, alta albuminuria normal, microalbuminuria y macroalbuminuria. Normalmente, la barrera de permeabilidad de filtración glomerular, que está compuesta por podocitos, membrana basal glomerular y células endoteliales, evita que la proteína del suero se filtre a la orina. La albuminuria puede reflejar lesión de la barrera de permeabilidad de filtración glomerular. La albuminuria puede calcularse a partir de una muestra de orina de 24 horas, una muestra de orina nocturna o una muestra de orina puntual.

[0030] "Albuminuria alta normal" significa albuminuria elevada caracterizada por (i) la excreción de 15 a <30 mg de albúmina en la orina por 24 horas y/o (ii) una relación de albúmina/creatinina de 1,25 a <2,5 mg/mmol (o 10 a <20 mg/g) en hombres o 1,75 a <3,5 mg/mmol (o 15 a <30 mg/g) en mujeres.

[0031] "Microalbuminuria" significa elevada albuminuria caracterizada por (i) la excreción de 30 a 300 mg de albúmina en la orina por 24 horas y/o (ii) una relación de albúmina/creatinina de 2,5 a <25 mg/mmol (o 20 a <200 mg/g) en hombres o 3,5 a <35 mg/mmol (o 30 a <300 mg/g) en mujeres.

[0032] "Macroalbuminuria" significa elevada albuminuria caracterizada por la excreción de más de 300 mg de albúmina en la orina por 24 horas y/o (ii) una relación de albúmina/creatinina de >25 mg/mmol (o >200 mg/g) en hombres o >35 mg/mmol (o >300 mg/g) en mujeres.

[0033] "Relación de albúmina/creatinina" significa la relación de albúmina en la orina (mg/dl) por creatinina en orina (g/dL) y se expresa como mg/g. En ciertas realizaciones, la relación albúmina/creatinina puede calcularse a partir de una muestra de orina puntual y puede usarse como una estimación de la excreción de albúmina durante un período de 24 horas.

[0034] "Tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) o "tasa de filtración glomerular (TFG)" significa una medida de lo bien los riñones están filtrando creatinina, y se utiliza como una estimación de la cantidad de sangre pasa a través de los glomérulos por minuto. Resultados normales pueden variar de 90-120 ml/min/1,73 m². Los niveles inferiores a 60 ml/min/1,73 m² durante 3 o más meses pueden ser un indicador de enfermedad renal crónica. Los niveles inferiores a 15 ml/min/1,73 m² pueden ser un indicador de insuficiencia renal.

[0035] "Proteinuria" significa la presencia de un exceso de proteínas de suero en la orina. Proteinuria puede caracterizarse por la excreción de >250 mg de proteína en la orina por 24 horas y/o una proteína de la orina a la proporción de creatinina de $\geq 0,20$ mg/mg. Las proteínas séricas elevadas en asociación con proteinuria incluyen, sin limitación, la albúmina.

[0036] "Nitrógeno ureico en sangre" o "BUN" significa una medida de la cantidad de nitrógeno en la sangre en la forma de urea. El hígado produce urea en el ciclo de la urea como un producto de desecho de la digestión de proteína, y la urea es eliminada de la sangre por los riñones. La sangre humana normal de adultos puede contener entre 7 y 21 mg de nitrógeno de urea por 100 ml (7-21 mg/dL) de sangre. La medición del nitrógeno ureico en sangre se usa como un indicador de la salud renal. Si los riñones no pueden eliminar la urea de la sangre normalmente, el BUN de un sujeto aumenta.

[0037] "Enfermedad renal en etapa terminal (ESRD)" significa la falla completa o casi completa de la función renal.

[0038] "Función renal deteriorada" significa función renal reducida, en relación con la función renal normal.

[0039] "Fibrosis" significa la formación o el desarrollo de un exceso de tejido conectivo fibroso en un órgano o tejido. En ciertas realizaciones, la fibrosis ocurre como un proceso reparativo o reactivo. En ciertas realizaciones, la fibrosis ocurre en respuesta a daño o lesión. El término "fibrosis" debe entenderse como la formación o el desarrollo de un exceso de tejido conectivo fibroso en un órgano o tejido como un proceso reparativo o reactivo, en oposición a una

formación de tejido fibroso como un componente normal de un órgano o tejido.

[0040] "Retarda la progresión adicional" significa reducir la velocidad a la que una condición médica se mueve hacia un estado avanzado.

[0041] "Detiene la progresión adicional" significa detener la progresión de una afección médica a un estado avanzado.

[0042] "Tiempo de retraso para la diálisis" significa mantener suficiente función renal tal que la necesidad de tratamiento de diálisis se retrase.

[0043] "Tiempo de retraso para el trasplante renal" significa mantener suficiente función renal de manera que se retrase la necesidad de un trasplante renal.

[0044] "Mejora la esperanza de vida" significa alargar la vida de un sujeto mediante el tratamiento de uno o más síntomas de una enfermedad en el sujeto.

[0045] "Anti-miR" significa un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleobase complementaria a un microARN. En ciertas realizaciones, un anti-miR es un oligonucleótido modificado.

[0046] "Anti-miR-X" donde "miR-X" designa un microARN particular, significa un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleobase complementaria a miR-X. En ciertas realizaciones, un anti-miR-X es completamente complementario (es decir, 100% complementario) a miR-X. En ciertas realizaciones, un anti-miR-X es al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% complementario a miR-X. En ciertas realizaciones, un anti-miR-X es un oligonucleótido modificado.

[0047] "miR-21" significa el miARN maduro que tiene la secuencia de nucleobase UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA (SEQ ID NO: 1).

[0048] "Secuencia de bucle madre miR-21" significa la secuencia de bucle madre que tiene la secuencia de nucleobase UGUCGGGUAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUGAAUCUCAUGGCAACACCAGUCGAU GGGCUGUCUGACA (SEQ ID NO: 2).

[0049] "Ácido nucleico diana" se refiere a un ácido nucleico al que un compuesto oligomérico está diseñado para hibridar.

[0050] "Orientación" significa el proceso de diseño y selección de secuencia de nucleobases que se hibridará a un ácido nucleico diana.

[0051] "Dirigido a" significa que tiene una secuencia de nucleobases que permitirá la hibridación a un ácido nucleico diana.

[0052] "Modulación" significa una perturbación de la función, la cantidad, o actividad. En ciertas realizaciones, la modulación significa un aumento en la función, cantidad o actividad. En ciertas realizaciones, la modulación significa una disminución en la función, cantidad, o actividad.

[0053] "Expresión" significa cualquier función y paso por el cual la información codificada de un gen se convierte en estructuras presentes y que operan en una célula.

[0054] "Secuencia de nucleobases" significa el orden de nucleobases contiguas en un compuesto oligomérico o nucleico ácido, típicamente enumerados en una orientación 5' a 3', independiente de cualquier modificación de azúcar, enlace, y/o nucleobase.

[0055] "Nucleobases contiguas" significa nucleobases inmediatamente adyacentes la una a la otra en un ácido nucleico.

[0056] "Complementariedad de nucleobase" significa la capacidad de dos nucleobases para emparejarse de manera no covalente a través de enlaces de hidrógeno.

[0057] "Complementario" significa que un ácido nucleico es capaz de hibridarse con otro ácido nucleico o oligonucleótido. En ciertas realizaciones, complementario se refiere a un oligonucleótido capaz de hibridarse con un ácido nucleico diana.

[0058] "Totalmente complementario" significa que cada nucleobase de un oligonucleótido es capaz de aparearse con una nucleobase en cada posición correspondiente en un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido es completamente complementario a un microARN, es decir, cada nucleobase del oligonucleótido es complementaria a una nucleobase en una posición correspondiente en el microARN. En ciertas formas de realización,

un oligonucleótido en donde cada nucleobase tiene complementariedad con una nucleobase dentro de una región de una secuencia de bucle madre de microARN es completamente complementaria a la secuencia de bucle madre de microARN.

- 5 **[0059]** Porcentaje de complementariedad significa el porcentaje de nucleobases de un oligonucleótido que son complementarias a una porción de igual longitud de un ácido nucleico diana. El porcentaje de complementariedad se calcula dividiendo el número de nucleobases del oligonucleótido que son complementarias a las nucleobases en las posiciones correspondientes en el ácido nucleico diana por el número total de nucleobases en el oligonucleótido.
- 10 **[0060]** "Porcentaje de identidad" significa el número de nucleobases en un primer ácido nucleico que son idénticas a nucleobases en posiciones correspondientes en un segundo ácido nucleico, dividido por el número total de nucleobases en el primer ácido nucleico. En ciertas realizaciones, el primer ácido nucleico es un microARN y el segundo ácido nucleico es un microARN. En ciertas realizaciones, el primer ácido nucleico es un oligonucleótido y el segundo ácido nucleico es un oligonucleótido.
- 15 **[0061]** "Hibridar" significa que la hibridación de ácidos nucleicos complementarios se produce a través de la complementariedad de nucleobases.
- 20 **[0062]** "No coincidencia" significa una nucleobase de un primer ácido nucleico que no es capaz de emparejarse con Watson-Crick con una nucleobase en la posición correspondiente de un segundo ácido nucleico.
- [0063]** "Idéntico" en el contexto de secuencias de nucleobases, significa que tiene la misma secuencia de nucleobase, independiente de las modificaciones de azúcar, de enlace, y/o de nucleobases e independiente del estado de metilo de cualesquiera pirimidinas presentes.
- 25 **[0064]** "MicroARN" significa un ARN no codificante endógeno entre 18 y 25 nucleobases de longitud, que es el producto de la escisión de un pre-microARN por la enzima Dicer. Se encuentran ejemplos de microARN maduros en la base de datos de microARN conocida como miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>). En ciertas realizaciones, el microARN se abrevia como "microARN" o "miR".
- 30 **[0065]** "Pre-microARN" o "pre-MIR" significa un no codificante de ARN que tiene una estructura de horquilla, que es el producto de la escisión de un pri-MIR por la ribonucleasa de doble hebra de ARN específico conocido como Drosha.
- 35 **[0066]** "Secuencia de bucle de tallo" significa un ARN que tiene una estructura de horquilla y que contiene una secuencia de microARN madura. Las secuencias pre-microRNA y las secuencias de bucle de tallo pueden superponerse. Se encuentran ejemplos de secuencias de bucle de tallo en la base de datos de microARN conocida como miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>).
- 40 **[0067]** "Pri-microARN" o "pri-miR" significa un ARN no codificante que tiene una estructura de horquilla que es un sustrato para la ribonucleasa de doble hebra de ARN específico Drosha.
- 45 **[0068]** "Precursor de microARN" significa una transcripción que se origina a partir de un ADN genómico y que comprende un ARN estructurado no codificante que comprende una o más secuencias de microARN. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un precursor de microARN es un pre-microARN. En ciertas realizaciones, un precursor de microARN es un pri-microARN.
- [0069]** "Transcripción regulada por microARN" significa una transcripción que está regulada por un microARN.
- 50 **[0070]** "Secuencia de semilla" significa una secuencia de nucleobase que comprende de 6 a 8 nucleobases contiguas de nucleobases 1 a 9 del extremo 5' de una secuencia de microARN maduro.
- [0071]** "Secuencia de coincidencia de semilla" significa una secuencia de nucleobases que es complementaria a una secuencia de semillas, y es la misma longitud que la secuencia de semilla.
- 55 **[0072]** "Compuesto oligomérico" se refiere a un compuesto que comprende una pluralidad de subunidades monoméricas enlazadas. Los compuestos oligoméricos incluyen oligonucleótidos.
- [0073]** "Oligonucleótido" se refiere a un compuesto que comprende una pluralidad de nucleósidos enlazados, cada uno de los cuales pueden ser modificados o no modificados, independientes uno del otro.
- 60 **[0074]** "Enlace internucleosídico natural" significa un enlace fosfodiéster 3' a 5' entre nucleósidos.
- [0075]** "Azúcar natural" significa un azúcar que se encuentra en el ADN (2'-H) o ARN (2'-OH).
- 65 **[0076]** "Enlace internucleosídico" significa un enlace covalente entre nucleósidos adyacentes.

[0077] "Nucleósidos unidos" significa nucleósidos unidos por un enlace covalente.

[0078] "Nucleobase" significa un resto heterocíclico capaz de apareamiento de forma no covalente con otra nucleobase.

[0079] "Nucleósidos" significa una nucleobase ligado a un resto de azúcar.

[0080] "Nucleótido" significa un nucleósido que tiene un grupo fosfato unido covalentemente a la porción de azúcar de un nucleósido.

[0081] "Compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en" una cantidad de nucleósidos unidos significa un compuesto que incluye un oligonucleótido modificado que tiene el número especificado de nucleósidos unidos. Por lo tanto, el compuesto puede incluir sustituyentes o conjugados adicionales. A menos que se indique lo contrario, el compuesto no incluye ningún nucleósido adicional más allá de los del oligonucleótido modificado.

[0082] "Oligonucleótido modificado" significa un oligonucleótido que tiene una o más modificaciones relativas a un enlace terminal, azúcar, nucleobase y/o internucleósido natural. Un oligonucleótido modificado puede comprender nucleósidos no modificados.

[0083] Por "oligonucleótido modificado de cadena sencilla" se entiende un oligonucleótido modificado que no se hibrida con una cadena complementaria.

[0084] "Nucleósido modificado" significa un nucleósido que tiene cualquier cambio de un nucleósido de origen natural. Un nucleósido modificado puede tener un azúcar modificado y una nucleobase no modificada. Un nucleósido modificado puede tener un azúcar modificado y una nucleobase modificada. Un nucleósido modificado puede tener un azúcar natural y una nucleobase modificada. En ciertas realizaciones, un nucleósido modificado es un nucleósido bicíclico. En ciertas realizaciones, un nucleósido modificado es un nucleósido no bicíclico.

[0085] "Enlace internucleosídico modificado" significa cualquier cambio de un enlace internucleósido natural.

[0086] "Enlace internucleosídico de fosforotioato" significa un enlace entre nucleósidos donde uno de los átomos que no forman puentes es un átomo de azufre.

[0087] "Resto de azúcar modificado" significa la sustitución y/o cualquier cambio de un azúcar natural.

[0088] "Nucleobase no modificada" significa las bases de origen natural heterocíclicas de ARN o ADN de las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) (incluyendo 5-metilcitosina) y uracilo (U).

[0089] "5-metilcitosina" significa una citosina que comprende un grupo metilo unido a la posición 5.

[0090] "Citosina no metilada" significa una citosina que no tiene un grupo metilo unido a la posición 5.

[0091] "Nucleobase modificada" significa cualquier nucleobase que no sea una nucleobase no modificada.

[0092] Por "fracción de azúcar" se entiende un furanosilo natural o una fracción de azúcar modificada.

[0093] "Resto de azúcar modificado" significa un resto de azúcar sustituido o un sustituto de azúcar.

[0094] "Azúcar 2'-O-metil" o "azúcar de 2'-OMe" significa un azúcar que tiene una modificación O-metilo en la posición 2'.

[0095] "Azúcar 2'-O-metoxietilo" o "azúcar de 2'-MOE" significa un azúcar que tiene una modificación O-metoxietilo en la posición 2'.

[0096] "2'-fluoro" o "2'-F" significa un azúcar que tiene una modificación fluoro de la posición 2'.

[0097] Por "fracción de azúcar bicíclica" se entiende una fracción de azúcar modificada que comprende un anillo de 4 a 7 miembros (incluido, entre otros, un furanosilo) que comprende un puente que conecta dos átomos del anillo de 4 a 7 miembros para formar un segundo anillo, lo que da como resultado una estructura bicíclica. En ciertas realizaciones, el anillo de 4 a 7 miembros es un anillo de azúcar. En ciertas realizaciones, el anillo de 4 a 7 miembros es un furanosilo. En ciertas realizaciones de este tipo, el puente conecta el carbono 2' y el carbono 4' del furanosilo. Los restos de azúcar bicíclicos ejemplares no limitantes incluyen LNA, ENA, cEt, S-cEt y R-cEt.

[0098] "Resto de azúcar de ácido nucleico bloqueado (LNA)" significa un resto de azúcar sustituido que comprende

un puente (CH₂)-O entre los átomos del anillo de furanosa 4' y 2'.

[0099] "Resto de azúcar ENA" significa un resto de azúcar sustituido que comprende un puente (CH₂)₂-O entre los átomos del anillo de furanosa 4' y 2'.

[0100] "Resto de azúcar de acetato restringido (CET)" significa un resto de azúcar sustituido que comprende un puente CH(CH₃)-O entre los átomos en el anillo de furanosa 4' y 2'. En ciertas realizaciones, el puente CH(CH₃)-O está limitado en la orientación S. En ciertas realizaciones, el (CH₂)₂-O está restringido en la orientación R.

[0101] "Resto de azúcar S-CET" significa un resto de azúcar sustituido que comprende un puente CH(CH₃)-O S-constreñido entre la posición de átomos 4' y 2' en el anillo de furanosa.

[0102] "Resto de azúcar R-CET" significa un resto de azúcar sustituido que comprende un un puente CH(CH₃)-O R-constreñido entre la posición de átomos 4' y 2' en el anillo de furanosa.

[0103] "2'-O-metil nucleósido" significa un nucleósido modificado en 2' que tiene una modificación de azúcar en 2'-O-metilo.

[0104] "2'-O-metoxietil nucleósido" significa un nucleósido modificado en 2' que tiene una modificación de azúcar 2'-O-metoxietil. Un nucleósido de 2'-O-metoxietilo puede comprender una nucleobase modificada o no modificada.

[0105] "2'-fluoro nucleósido" significa un nucleósido modificado en 2' que tiene una modificación de azúcar en 2'-fluoro. Un 2'-fluoro nucleósido puede comprender una nucleobase modificada o no modificada.

[0106] "Nucleósido bicíclico" significa un nucleósido modificado en 2' que tiene un resto de azúcar bicíclico. Un nucleósido bicíclico puede tener una nucleobase modificada o no modificada.

[0107] "Nucleósido cEt" significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar cEt. Un nucleósido cEt puede comprender una nucleobase modificada o no modificada.

[0108] "Nucleósido S-cEt" significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar S-cEt.

[0109] "Nucleósido R-cEt" significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar R-cEt.

[0110] "β-D-desoxirribonucleósido" significa un nucleósido de ADN natural.

[0111] "β-D-ribonucleósido" significa un nucleósido de ARN natural.

[0112] "Nucleósido de LNA" significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar de LNA.

[0113] "Nucleósido ENA" significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar ENA.

[0114] "Sujeto" significa un animal humano o no humano seleccionado para tratamiento o terapia.

[0115] "Sujeto en necesidad del mismo" significa un sujeto que se identifica como en la necesidad de una terapia o tratamiento.

[0116] "Sujeto sospechoso de tener" significa un sujeto que muestra uno o más indicadores clínicos de una enfermedad.

[0117] "Administrar" significa proporcionar un agente o composición farmacéutica a un sujeto, e incluye, pero no está limitado a, la administración por un profesional médico y la auto-administración.

[0118] "Administración parenteral" significa administración a través de inyección o infusión. La administración parenteral incluye, pero no se limita a, administración subcutánea, administración intravenosa, e intramuscular.

[0119] "Administración subcutánea" se refiere a la administración justo debajo de la piel.

[0120] "Administración intravenosa" significa administración en una vena.

[0121] "Administrado concomitantemente" se refiere a la administración conjunta de dos o más agentes de cualquier manera en la que los efectos farmacológicos de ambos se manifiesten en el paciente al mismo tiempo. La administración no requiere que ambos agentes se administren en una única composición farmacéutica, en la misma forma de dosificación o por la misma vía de administración. Los efectos de ambos agentes no necesitan manifestarse al mismo tiempo. Los efectos solo necesitan superponerse por un período de tiempo y no necesitan ser coextensivos.

[0122] "Duración" significa el período de tiempo durante el cual continúa una actividad o evento. En ciertas realizaciones, la duración del tratamiento es el período de tiempo durante el cual se administran dosis de un agente farmacéutico o composición farmacéutica.

5 **[0123]** "Terapia" significa un método de tratamiento de la enfermedad. En ciertas realizaciones, la terapia incluye, pero no se limita a, quimioterapia, radioterapia o administración de un agente farmacéutico.

10 **[0124]** "Tratamiento" significa la aplicación de uno o más procedimientos específicos usados para la curación o mejora de una enfermedad. En ciertas realizaciones, el procedimiento específico es la administración de uno o más agentes farmacéuticos.

15 **[0125]** "Mejorar" significa disminuir la gravedad de al menos un indicador de una afección o enfermedad. En ciertas realizaciones, la mejora incluye un retraso o desaceleración en la progresión de uno o más indicadores de una afección o enfermedad. La gravedad de los indicadores puede determinarse mediante medidas subjetivas u objetivas que son conocidas por los expertos en la materia.

20 **[0126]** "En riesgo de desarrollar" significa el estado en donde un sujeto está predispuesto a desarrollar una afección o enfermedad. En ciertas realizaciones, un sujeto en riesgo de desarrollar una afección o enfermedad exhibe uno o más síntomas de la afección o enfermedad, pero no exhibe un número suficiente de síntomas para ser diagnosticado con la afección o enfermedad. En ciertas realizaciones, un sujeto en riesgo de desarrollar una afección o enfermedad exhibe uno o más síntomas de la afección o enfermedad, pero en menor medida se requiere que se le diagnostique la afección o enfermedad.

25 **[0127]** "Prevenir la aparición de" significa prevenir el desarrollo de una afección o enfermedad en un sujeto que está en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección. En ciertas realizaciones, un sujeto en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección recibe un tratamiento similar al tratamiento recibido por un sujeto que ya tiene la enfermedad o afección.

30 **[0128]** "Retrasar el inicio de" significa retrasar el desarrollo de una afección o enfermedad en un sujeto que está en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección. En ciertas realizaciones, un sujeto en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección recibe un tratamiento similar al tratamiento recibido por un sujeto que ya tiene la enfermedad o afección.

35 **[0129]** "Agente terapéutico" significa un agente farmacéutico usado para la cura, mejora o prevención de una enfermedad.

40 **[0130]** "Dosis" significa una cantidad especificada de un agente farmacéutico proporcionado en una sola administración. En ciertas realizaciones, una dosis puede administrarse en dos o más bolos, tabletas o inyecciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, donde se desea la administración subcutánea, la dosis deseada requiere un volumen que no se acomoda fácilmente con una sola inyección. En tales realizaciones, se pueden usar dos o más inyecciones para lograr la dosis deseada. En ciertas realizaciones, se puede administrar una dosis en dos o más inyecciones para minimizar la reacción en el sitio de inyección en un individuo. En ciertas realizaciones, una dosis se administra como una infusión lenta.

45 **[0131]** "Unidad de dosificación" significa una forma en la que se proporciona un agente farmacéutico. En ciertas realizaciones, una unidad de dosificación es un vial que contiene oligonucleótido liofilizado. En ciertas realizaciones, una unidad de dosificación es un vial que contiene oligonucleótido reconstituido.

50 **[0132]** "Cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un agente farmacéutico que proporciona un beneficio terapéutico a un animal.

55 **[0133]** "Composición farmacéutica" significa una mezcla de sustancias adecuadas para administrar a un individuo que incluye un agente farmacéutico. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender una solución acuosa estéril.

[0134] "Agente farmacéutico" significa una sustancia que proporciona un efecto terapéutico cuando se administra a un sujeto.

60 **[0135]** "Ingrediente farmacéutico activo" significa la sustancia en una composición farmacéutica que proporciona un efecto deseado.

65 **[0136]** "Función de órgano mejorada" significa un cambio en la función del órgano hacia límites normales. En ciertas realizaciones, la función del órgano se evalúa midiendo moléculas encontradas en la sangre u orina de un sujeto. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la función renal mejorada se mide mediante una reducción en el nitrógeno de urea en sangre, una reducción en proteinuria, una reducción en albuminuria, etc.

[0137] "Perfil de seguridad aceptable" significa un patrón de efectos secundarios que está clínicamente dentro de límites aceptables.

[0138] "Efecto secundario" significa una respuesta fisiológica atribuible a un tratamiento distinto de los efectos deseados. En ciertas realizaciones, los efectos secundarios incluyen, sin limitación, reacciones en el sitio de inyección, anomalías de la prueba de función hepática, anomalías de la función renal, toxicidad hepática, toxicidad renal, anomalías del sistema nervioso central y miopatías. Dichos efectos secundarios pueden detectarse directa o indirectamente. Por ejemplo, el aumento de los niveles de aminotransferasa en suero puede indicar toxicidad hepática o anomalía de la función hepática. Por ejemplo, el aumento de la bilirrubina puede indicar toxicidad hepática o anomalía de la función hepática.

[0139] "Cumplimiento del sujeto" significa la adherencia a un tratamiento recomendado o prescrito por un sujeto.

[0140] "Cumplir" significa la adhesión a una terapia recomendada por un sujeto.

[0141] "Terapia recomendada" significa un tratamiento recomendado por un profesional médico para el tratamiento, mejora o prevención de una enfermedad.

[0142] El término "sangre" como se usa en el presente documento, abarca sangre entera y fracciones de sangre, tales como suero y plasma.

Descripción general

[0143] El síndrome de Alport es una forma hereditaria de enfermedad renal en la que se produce un nivel anormal de membrana basal glomerular (GBM), que conduce a fibrosis intersticial, esclerosis glomerular y típicamente conduce a enfermedad renal en etapa terminal. En el tratamiento del síndrome de Alport, el objetivo principal del tratamiento es mantener la función renal y prevenir la aparición de enfermedad renal en etapa terminal (ESRD), que a su vez mejora la esperanza de vida de los sujetos con síndrome de Alport.

[0144] El síndrome de Alport se caracteriza por fibrosis progresiva debido a defectos en la composición de GBM, por lo tanto, son deseables mejoras en la morfología y función de GBM. Se demuestra aquí que el oligonucleótido modificado dirigido a miR-21 mejora la función renal en un modelo experimental de Síndrome de Alport. Además, la esclerosis glomerular y la fibrosis se reducen después del tratamiento anti-miR-21. Se demuestra además aquí que anti-miR-21 mejora la supervivencia en un modelo experimental de Síndrome de Alport. Como tal, estos oligonucleótidos modificados dirigidos a miR-21 son útiles para el tratamiento del síndrome de Alport.

Ciertos usos de la invención

[0145] Como se señaló anteriormente, la presente invención proporciona un oligonucleótido modificado que consta de 12 a 25 nucleósidos enlazados, para su uso en un método para tratar el síndrome de Alport comprende administrar a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene el síndrome de Alport el oligonucleótido modificado, en donde la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es complementaria a miR-21.

[0146] En ciertas realizaciones, el sujeto ha sido diagnosticado con Síndrome de Alport antes de la administración del oligonucleótido modificado. El diagnóstico del síndrome de Alport se puede lograr mediante la evaluación de parámetros que incluyen, entre otros, los antecedentes familiares de un sujeto, características clínicas (que incluyen, entre otros, proteinuria, albuminuria, hematuria, insuficiencia cardíaca congestiva, sordera y/o cambios oculares) y los resultados de las biopsias de tejido. Las biopsias renales pueden analizarse para detectar la presencia o ausencia de las cadenas de colágeno tipo IV alfa-3, alfa-4 y alfa-5. Además, los cambios estructurales en el glomérulo se pueden detectar mediante microscopía electrónica de material de biopsia renal. Se puede analizar una biopsia de piel para detectar la presencia de la cadena de colágeno alfa-5 de tipo IV, que normalmente está presente en la piel y casi siempre está ausente en sujetos masculinos con la forma ligada al X del síndrome de Alport. El diagnóstico del síndrome de Alport también puede incluir la detección de mutaciones en uno o más de los genes *Col4a3*, *Col4a4* o *Col4a5*.

[0147] En ciertas realizaciones, los niveles de miR-21 aumentan en el riñón de un sujeto que tiene el síndrome de Alport. En ciertas realizaciones, antes de la administración, se determina que un sujeto tiene un nivel aumentado de miR-21 en el riñón. Los niveles de miR-21 pueden medirse a partir de material de biopsia renal. En ciertas realizaciones, antes de la administración, se determina que un sujeto tiene un nivel aumentado de miR-21 en la orina o la sangre del sujeto.

[0148] En ciertas realizaciones, la administración de un oligonucleótido modificado complementario a miR-21 da como resultado uno o más resultados clínicamente beneficiosos. En ciertas realizaciones, la administración mejora la función renal. En ciertas realizaciones, la administración retrasa el inicio de la enfermedad renal en etapa terminal. En ciertas realizaciones, la administración retrasa el tiempo de diálisis. En ciertas realizaciones, la administración retrasa el tiempo para el trasplante renal. En ciertas realizaciones, la administración mejora la esperanza de vida del sujeto.

[0149] En ciertas realizaciones, la administración reduce la fibrosis renal. En ciertas realizaciones, la administración ralentiza la progresión adicional de la fibrosis renal. En ciertas realizaciones, la administración detiene la progresión adicional de la fibrosis renal. En ciertas realizaciones, la administración reduce la hematuria. En ciertas realizaciones, la administración retrasa el inicio de la hematuria. En ciertas realizaciones, la administración reduce la proteinuria. En ciertas realizaciones, la administración retrasa la aparición de proteinuria.

[0150] El sujeto que tiene o se sospecha que tiene el síndrome de Alport puede tener una mutación en el gen que codifica la cadena alfa 3 del colágeno tipo IV (*Col4a3*), una mutación en el gen que codifica la cadena alfa 4 del colágeno tipo IV (*Col4a4*), o una mutación en el gen que codifica la cadena alfa 5 del colágeno tipo IV (*Col4a5*). En ciertas realizaciones, el sujeto es masculino. En ciertas realizaciones, el sujeto es femenino.

[0151] En ciertas realizaciones, el sujeto tiene una función renal alterada. En ciertas realizaciones, el sujeto necesita una función renal mejorada. En ciertas realizaciones, se identifica que el sujeto tiene una función renal alterada. En ciertas realizaciones, se identifica que el sujeto tiene hematuria. En ciertas realizaciones, se identifica que el sujeto tiene proteinuria.

[0152] En cualquiera de las realizaciones proporcionadas en el presente documento, un sujeto puede someterse a ciertas pruebas para evaluar la función renal. Dichas pruebas incluyen, sin limitación, la medición de nitrógeno ureico en sangre en el sujeto; medir la creatinina en la sangre del sujeto; medir el aclaramiento de creatinina en la sangre del sujeto; medir proteinuria en el sujeto; medición de la relación albúmina: creatinina en el sujeto; medir la tasa de filtración glomerular en el sujeto; y medir el gasto urinario en el sujeto.

[0153] En cualquiera de las realizaciones proporcionadas en el presente documento, las proteínas presentes en la orina o la sangre pueden usarse para evaluar la función renal. Dichas pruebas de la función renal incluyen, entre otras, la medición de la proteína N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) en la orina del sujeto; medir la proteína lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) en la orina del sujeto; medir la proteína de la molécula 1 de lesión renal (KIM-1) en la orina del sujeto; medir la proteína interleucina-18 (IL-18) en la orina del sujeto; medir los niveles del factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) en la orina del sujeto; medir los niveles de proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1) en la orina del sujeto; medir fragmentos de colágeno IV (Col IV) en la orina del sujeto; medir los niveles de fragmentos de colágeno III (Col III) en la orina del sujeto; medir la proteína cistatina Cen la sangre de un sujeto; medir la proteína de traza β (BTP) en la sangre de un sujeto; y medir 2-microglobulina (B2M) en la sangre de un sujeto. En cualquiera de las realizaciones proporcionadas en el presente documento, los marcadores de la lesión por podocitos puede medirse en la orina. Dichas proteínas incluyen nefrina y podocina. Las proteínas pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA) utilizando kits disponibles comercialmente.

[0154] En cualquiera de las realizaciones proporcionadas en el presente documento, la administración de un oligonucleótido modificado dirigido a miR-21 mejora uno o más marcadores de la función renal en el sujeto. Las mejoras en los marcadores de la función renal incluyen, sin limitación: reducción del nitrógeno ureico en sangre en el sujeto; creatinina reducida en la sangre del sujeto; aclaramiento de creatinina mejorado en el sujeto; proteinuria reducida en el sujeto; relación reducida de albúmina: creatinina en el sujeto; tasa de filtración glomerular mejorada en el sujeto; y/o aumento de la producción urinaria en el sujeto.

Ciertas terapias adicionales

[0155] Los tratamientos para el síndrome de Alport o cualquiera de las afecciones enumeradas aquí pueden comprender más de una terapia. Como tal, en ciertas realizaciones proporcionadas en el presente documento, se describen métodos para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene el síndrome de Alport que comprende administrar al menos una terapia además de administrar un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobase complementaria a un miR-21.

[0156] En ciertas realizaciones, la al menos una terapia adicional comprende un agente farmacéutico.

[0157] En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos incluyen bloqueadores del receptor de angiotensina II (ARB). En ciertas realizaciones, un bloqueador del receptor de angiotensina II es candesartán, irbesartán, olmesartán, losartán, valsartán, telmisartán o eprosartán.

[0158] En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos incluyen inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II (ACE).

[0159] En ciertas realizaciones, un inhibidor de la ECA es captopril, enalapril, lisinopril, benazepril, quinapril, fosinopril o ramipril usado para controlar la presión sanguínea del sujeto.

[0160] En ciertas realizaciones, un agente farmacéutico es un análogo de vitamina D. Los análogos de la vitamina D pueden usarse para limitar la producción de hormona paratiroidea en el sujeto.

[0161] En ciertas realizaciones, un agente farmacéutico es un aglutinante de fosfato oral que reduce la absorción de fosfato en la dieta.

5 **[0162]** En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos incluyen agentes inmunosupresores. En ciertas realizaciones, un agente inmunosupresor es un corticosteroide, ciclofosfamida o micofenolato de mofetilo.

[0163] En ciertas realizaciones, un agente farmacéutico es ciclosporina, un inhibidor A de la coenzima HMG, un inhibidor de vasopectidasa o un antagonista de TGF-beta.

10 **[0164]** En ciertas realizaciones, una terapia adicional es la terapia génica. En ciertas realizaciones, la terapia génica proporciona un gen Col4a3 normal. En ciertas realizaciones, la terapia génica proporciona un gen Col4a4 normal. En ciertas realizaciones, la terapia génica proporciona un gen Col4a5 normal.

15 **[0165]** En ciertas realizaciones, una terapia adicional es la diálisis. En ciertas realizaciones, una terapia adicional es trasplante renal.

[0166] En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos incluyen agentes antiinflamatorios. En ciertas realizaciones, un agente antiinflamatorio es un agente antiinflamatorio esteroideo. En ciertas realizaciones, un agente antiinflamatorio esteroideo es un corticosteroide. En ciertas realizaciones, un corticosteroide es prednisona. En ciertas realizaciones, un agente antiinflamatorio es un medicamento antiinflamatorio no esteroideo. En ciertas realizaciones, un agente antiinflamatorio no esteroideo es ibuprofeno, un inhibidor de COX-I o un inhibidor de COX-2.

25 **[0167]** En ciertas realizaciones, un agente farmacéutico es un agente farmacéutico que bloquea una o más respuestas a señales fibrogénicas.

[0168] En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos incluyen agente antidiabético. Los agentes antidiabéticos incluyen, pero no se limitan a, biguanidas, inhibidores de glucosidasa, insulinas, sulfonilureas y tiazolidendionas.

30 *Ciertas secuencias de nucleobase de microARN*

[0169] Los oligonucleótidos modificados descritos aquí tienen una secuencia de nucleobase que es complementaria a miR-21 (SEQ ID NO: 1), o un precursor de la misma (SEQ ID NO: 2). En ciertas realizaciones, cada nucleobase del oligonucleótido modificado es capaz de experimentar un emparejamiento de bases con una nucleobase en cada posición correspondiente en la secuencia de nucleobase de miR-21, o un precursor del mismo. En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleobase de un oligonucleótido modificado puede tener uno o más pares de bases no coincidentes con respecto a la secuencia de nucleobase de miR-21 o la secuencia precursora, y sigue siendo capaz de hibridarse con su secuencia diana.

40 **[0170]** Al estar la secuencia de miR-21 contenida dentro de la secuencia precursora de miR-21, un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobases complementaria a miR-21 también es complementario a una región del precursor de miR-21.

45 **[0171]** En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en un número de nucleósidos unidos que es igual a la longitud de miR-21.

[0172] En ciertas realizaciones, el número de nucleósidos unidos de un oligonucleótido modificado es menor que la longitud de miR-21. Un oligonucleótido modificado que tiene un número de nucleósidos unidos que es menor que la longitud de miR-21, en donde cada nucleobase del oligonucleótido modificado es complementario a cada nucleobase en la posición correspondiente de miR-21, se considera un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobase que es completamente complementaria a una región de la secuencia miR-21. Por ejemplo, un oligonucleótido modificado que consta de 19 nucleósidos unidos, donde cada nucleobase es complementaria a una posición correspondiente de miR-21 que tiene 22 nucleobases de longitud, es completamente complementaria a una región de 19 nucleobase de miR-21. Tal oligonucleótido modificado tiene 100% de complementariedad con una porción de 19 nucleobases de miR-21, y se considera que es 100% complementario de miR-21.

[0173] En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado comprende una secuencia de nucleobase que es complementaria a una secuencia de semillas, es decir, un oligonucleótido modificado comprende una secuencia de coincidencia de semillas. En ciertas realizaciones, una secuencia semilla es una secuencia semilla hexamer. En ciertas realizaciones de este tipo, una secuencia semilla es nucleobases 1-6 de miR-21. En ciertas realizaciones de este tipo, una secuencia semilla es nucleobases 2-7 de miR-21. En ciertas de tales realizaciones, una secuencia semilla es nucleobases 3-8 de miR-21. En ciertas realizaciones, una secuencia de semillas es una secuencia de semillas de heptamer. En ciertas de tales realizaciones, una secuencia semilla heptamer es nucleobases 1-7 de miR-21. En ciertas de tales realizaciones, una secuencia de semillas de heptamer es nucleobases 2-8 de miR-21. En ciertas realizaciones, la secuencia de semillas es una secuencia de semillas octamérica. En ciertas realizaciones de este tipo, una secuencia de semillas de octamer es nucleobases 1-8 de miR-21. En ciertas realizaciones, una secuencia semilla octamérica

es nucleobases 2-9 de miR-21.

[0174] En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase que tiene un desajuste con respecto a la secuencia de nucleobase de miR-21, o un precursor del mismo. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase que tiene dos apareamientos erróneos con respecto a la secuencia de nucleobase de miR-21, o un precursor de la misma. En ciertas de tales realizaciones, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase que no tiene más de dos apareamientos erróneos con respecto a la secuencia de nucleobase de miR-21, o un precursor de la misma. En ciertas de tales realizaciones, las nucleobases desajustadas son contiguas. En ciertas de tales realizaciones, las nucleobases desajustadas no son contiguas.

[0175] En ciertas realizaciones, el número de nucleósidos unidos de un oligonucleótido modificado es mayor que la longitud de miR-21. En ciertas realizaciones de este tipo, la nucleobase de un nucleósido adicional es complementaria a una nucleobase de la secuencia miR-21 tallo-bucle. En ciertas realizaciones, el número de nucleósidos unidos de un oligonucleótido modificado es uno mayor que la longitud de miR-21. En ciertas realizaciones de este tipo, el nucleósido adicional está en el extremo 5' de un oligonucleótido. En ciertas de tales realizaciones, el nucleósido adicional está en el extremo 3' de un oligonucleótido. En ciertas realizaciones, el número de nucleósidos unidos de un oligonucleótido modificado es dos mayor que la longitud de miR-21. En ciertas realizaciones de este tipo, los dos nucleósidos adicionales están en el extremo 5' de un oligonucleótido. En ciertas realizaciones de este tipo, los dos nucleósidos adicionales están en el extremo 3' de un oligonucleótido. En ciertas de tales realizaciones, un nucleósido adicional está ubicado en el extremo 5' y un nucleósido adicional está ubicado en el extremo 3' de un oligonucleótido. En ciertas realizaciones, una región del oligonucleótido puede ser completamente complementaria a la secuencia de nucleobase de miR-21, pero el oligonucleótido modificado completo no es completamente complementario a miR-21. Por ejemplo, un oligonucleótido modificado que consiste en 24 nucleósidos unidos, donde las nucleobases de nucleósidos 1 a 22 son cada una complementaria a una posición correspondiente de miR-21 que es 22 nucleobases de longitud, tiene una porción de 22 nucleósidos que es completamente complementaria a la secuencia de nucleobase de miR-21 y aproximadamente 92% de complementariedad global a la secuencia de nucleobase de miR-21.

Ciertos oligonucleótidos modificados

[0176] En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado tiene la estructura 5'-AECsATCsAGTCsTGAUsAAGCsTAE-3' (SEQ ID NO: 3), donde nucleósidos no seguidos por una el subíndice indica β-D-desoxirribonucleósidos; los nucleósidos seguidos de un subíndice "E" indican nucleósidos 2'-MOE; los nucleósidos seguidos de un subíndice "S" indican nucleósidos de S-cEt; y cada enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico de fosforotioato.

[0177] En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado tiene la estructura 5'-AECsATCsAsGTCsUsGAUsAsAGCsUSAE-3' (SEQ ID NO: 3), donde los nucleósidos no seguido de un subíndice indica β-D-desoxirribonucleósidos; los nucleósidos seguidos de un subíndice "E" indican nucleósidos 2'-MOE; los nucleósidos seguidos de un subíndice "S" indican nucleósidos de S-cEt; y cada enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico de fosforotioato.

[0178] En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado tiene la estructura 5'-^{Me}CCEAsAsTECsUsAAEUsAsAEGeCsTEAs' (SEQ ID NO: 4), donde los nucleósidos no seguidos por un subíndice indican β-D-desoxirribonucleósidos; los nucleósidos seguidos de un subíndice "E" indican nucleósidos 2'-MOE; los nucleósidos seguidos de un subíndice "S" indican nucleósidos de S-cEt; un superíndice "Me" indica un grupo 5-metilo en la base del nucleósido; y cada enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico de fosforotioato.

[0179] En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado tiene la estructura 5'-AECsAEtECsAEGeTECsTGAUsAAGCsUsAs-3' (SEQ ID NO: 3), donde los nucleósidos no seguidos por un subíndice indican β-D-desoxirribonucleósidos; los nucleósidos seguidos de un subíndice "E" indican nucleósidos 2'-MOE; los nucleósidos seguidos de un subíndice "S" indican nucleósidos de S-cEt; y cada enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico de fosforotioato.

[0180] En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado comprende una o más 5-metilcitosinas. En ciertas realizaciones, cada citosina de un oligonucleótido modificado comprende una 5-metilcitosina.

[0181] En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 8 a 30 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 12 a 25 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 15 a 30 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 15 a 25 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 15 a 19 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 15 a 16 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 19 a 24 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 21 a 24 nucleósidos unidos.

[0182] En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 8 nucleósidos unidos. En ciertas

realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 9 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 10 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 11 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 12 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 13 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 14 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 15 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 16 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 17 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 18 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 19 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 20 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 21 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 22 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 23 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 24 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado consta de 25 nucleósidos unidos.

Ciertas modificaciones

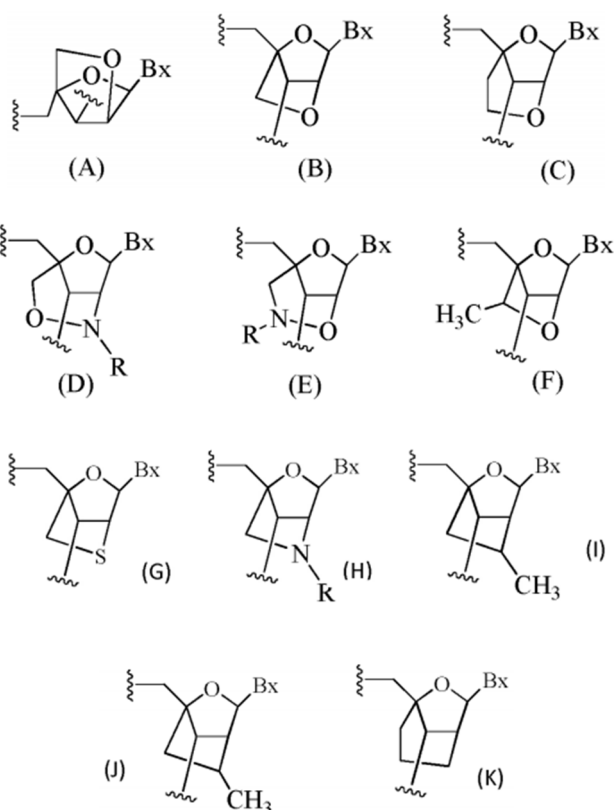
[0183] En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos descritos en el presente documento pueden comprender una o más modificaciones a una nucleobase, azúcar y/o enlace internucleosídico, y como tal es un oligonucleótido modificado. Una nucleobase modificada, azúcar y/o enlace internucleosídico puede seleccionarse sobre una forma no modificada debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad mejorada por otros oligonucleótidos u objetivos de ácido nucleico y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas.

[0184] En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado comprende uno o más nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, un nucleósido modificado es un nucleósido estabilizador. Un ejemplo de un nucleósido estabilizador es un nucleósido modificado con azúcar.

[0185] En ciertas realizaciones, un nucleósido modificado es un nucleósido modificado con azúcar. En ciertas realizaciones de este tipo, los nucleósidos modificados con azúcar pueden comprender además un resto de base heterocíclico natural o modificado y/o un enlace internucleósido natural o modificado y pueden incluir modificaciones adicionales independientes del azúcar modificación. En ciertas realizaciones, un nucleósido modificado con azúcar es un nucleósido modificado en 2', en donde el anillo de azúcar está modificado en el carbono 2' a partir de ribosa natural o 2'-desoxi-ribosa.

[0186] En ciertas realizaciones, un nucleósido modificado en 2' tiene un resto de azúcar bicíclico. En ciertas de tales realizaciones, el resto de azúcar bicíclico es un azúcar D en la configuración alfa. En ciertas de tales realizaciones, el resto de azúcar bicíclico es un azúcar D en la configuración beta. En ciertas de tales realizaciones, el resto de azúcar bicíclico es un azúcar L en la configuración alfa. En ciertas de tales realizaciones, el resto de azúcar bicíclico es un azúcar L en la configuración beta.

[0187] Los nucleósidos que comprenden tales restos de azúcares bicíclicos se refieren a nucleósidos como bicíclicos o BNAs. En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos que incluyen, pero no se limitan a, (A) γ -1-Metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA; (B) β -D-Metilenooxi (4'-CH₂-O-2') BNA; (C) Etilenoxi (4'-(CH₂)₂-O-2') BNA; (D) aminooxi (4'-CH₂-ON(R)-2') BNA; (E) oxiamino (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA; (F) de metilo (metilenoxi) (4'-CH(CH₃)-O-2') BNA (también referido como constreñido etilo o CET); (G) metileno-tio (4'-CH₂-S-2') BNA; (H) metileno-amino (4'-CH₂-N(R)-2') BNA; (I) carbocíclico de metilo (4'-CH₂-CH(CH₃)-2') BNA; (J) c-MOE (4'-CH₂-OMe-2') BNA y (K) propileno carbocíclico (4'-(CH₂)₃-2') BNA como se representa a continuación.



en donde Bx es un resto de nucleobase y R es, independientemente, H, un grupo protector, o C₁-C₁₂ alquilo.

[0188] En ciertas realizaciones, un nucleósido modificado en 2' comprende un grupo sustituyente en 2' seleccionado de F, OCF₃, OCH₃, OCH₂CH₂OCH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-ON (CH₃)₂, -O(CH₂)₂O(CH₂)₂N-(CH₃)₂ y OCH₂-C(=O)-N(H)CH₃.

[0189] En ciertas realizaciones, un nucleósido modificado en 2' comprende un grupo sustituyente 2' seleccionado de F, OCH₃, y OCH₂CH₂OCH₃.

[0190] En ciertas realizaciones, un nucleósido modificado con azúcar es un nucleósido modificado con 4'-tio. En ciertas realizaciones, un nucleósido modificado con azúcar es un nucleósido modificado 4'-tio-2'. Un nucleósido modificado con 4'-tio tiene un ribonucleósido β-D donde el 4'-O reemplazado 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 sustituyente en 2'. Grupos 2' sustituyentes adecuados incluyen 2'-OCH₃, 2'-O-(CH₂)₂-OCH₃, y 2'-F.

[0191] En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado comprende una o más modificaciones internucleosídicas. En ciertas realizaciones de este tipo, cada enlace internucleosídico de un oligonucleótido modificado es un enlace internucleosídico modificado. En ciertas realizaciones, un enlace internucleosídico modificado comprende un átomo de fósforo.

[0192] En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado comprende al menos un enlace de internucleósido de fosforotioato. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico de un oligonucleótido modificado es un enlace internucleosídico de fosforotioato.

[0193] En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado comprende una o más nucleobases modificadas. En ciertas realizaciones, una nucleobase modificada se selecciona de 5-hidroximetil citosina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina. En ciertas realizaciones, una nucleobase modificada se selecciona de 7-deaza-adenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. En ciertas realizaciones, una nucleobase modificada se selecciona de pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas N-2, N-6 y O-6, que incluyen 2 aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina.

[0194] En ciertas realizaciones, una nucleobase modificada comprende un heterociclo policíclico. En ciertas realizaciones, una nucleobase modificada comprende un heterociclo tricíclico. En ciertas realizaciones, una nucleobase modificada comprende un derivado de fenoxazina. En ciertas realizaciones, la fenoxazina puede modificarse adicionalmente para formar una nucleobase conocida en la técnica como una abrazadera G.

[0195] En ciertas realizaciones, un oligonucleótido modificado se conjuga con uno o más restos que potencian la actividad, la distribución celular o la captación celular de los oligonucleótidos antisentido resultantes. En ciertas de tales realizaciones, el resto es un resto de colesterol. En ciertas realizaciones, el resto es un resto lipídico. Los restos adicionales para la conjugación incluyen carbohidratos, fosfolípidos, biotina, fenazina, ácido fólico, fenantridina, antraquinona, acridina, fluorosceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. En ciertas realizaciones, el resto de carbohidrato es N-acetil-D-galactosamina (GalNac). En ciertas realizaciones, un grupo conjugado se une directamente a un oligonucleótido. En ciertas realizaciones, un grupo conjugado está unido a un oligonucleótido modificado por un resto de unión seleccionado de amino, hidroxilo, ácido carboxílico, tiol, insaturaciones (por ejemplo, enlaces dobles o triples), ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (ADO), succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), ácido 6-aminohexanoico (AHEx o AHA), alquilo C1-C10 sustituido, alqueno C2-C10 sustituido o no sustituido y C2-C10 sustituido o no sustituido alquilo. En ciertas de tales realizaciones, un grupo sustituyente se selecciona de hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenil, nitro, tiol, tioalcoxi, halógeno, alquilo, arilo, alqueno y alquilo.

[0196] En ciertas realizaciones de este tipo, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado que tiene uno o más grupos estabilizadores que están unidos a uno o ambos extremos de un oligonucleótido modificado para mejorar propiedades tales como, por ejemplo, la estabilidad de la nucleasa. Se incluyen en los grupos estabilizadores las estructuras de tapa. Estas modificaciones terminales 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 terminal 5' (5' tapa), o en el terminal 3' (3' tapa), o puede estar presente en ambas terminales. Las estructuras de la tapa incluyen, por ejemplo, las tapas desoxi abasicas invertidas.

Ciertas composiciones farmacéuticas

[0197] Se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden oligonucleótidos. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 15 a 25 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de nucleobase complementaria a miR-21. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende un compuesto que consiste en un oligonucleótido modificado que consta de 8 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de nucleobase complementaria a miR-21. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 25 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de nucleobase complementaria a miR-21.

[0198] Vías de administración adecuadas incluyen, pero no se limitan a, oral, rectal, transmucosa, intestinal, enteral, tópica, supositorio, por inhalación, intratecal, intracardiaca, intraventricular, intraperitoneal, intranasal, intraocular, intratumoral, y parenteral (por ejemplo, intravenoso, intramuscular, intramedular y subcutáneo). En ciertas realizaciones, los intratecales farmacéuticos se administran para lograr exposiciones locales en lugar de sistémicas. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden inyectarse directamente en el área del efecto deseado (por ejemplo, en el riñón).

[0199] En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica se administra en forma de una unidad de dosificación (por ejemplo, tableta, cápsula, bolo, etc.). En algunas realizaciones, una composición farmacéutica comprende un oligonucleótido modificado a una dosis dentro de un intervalo seleccionado de 25 mg a 800 mg, 25 mg a 700 mg, 25 mg a 600 mg, 25 mg a 500 mg, 25 mg a 400 mg, 25 mg a 300 mg, 25 mg a 200 mg, 25 mg a 100 mg, 100 mg a 800 mg, 200 mg a 800 mg, 300 mg a 800 mg, 400 mg a 800 mg, 500 mg a 800 mg, 600 mg a 800 mg, 100 mg a 700 mg, 150 mg a 650 mg, 200 mg a 600 mg, 250 mg a 550 mg, 300 mg a 500 mg, 300 mg a 400 mg y 400 mg a 600 mg. En ciertas realizaciones, tales composiciones farmacéuticas comprenden un oligonucleótido modificado en una dosis seleccionada de 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, 275 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 realizaciones de este tipo, una composición farmacéutica comprende una dosis de oligonucleótido modificado seleccionado de 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.

[0200] En ciertas realizaciones, un agente farmacéutico es un oligonucleótido modificado liofilizado estéril que se reconstituye con un diluyente adecuado, 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 farmacológico liofilizado consiste en un oligonucleótido modificado que se ha preparado en agua para inyección, o en solución salina para inyección, ajustado a pH 7,0-9,0 con ácido o base durante la preparación, y luego liofilizado. El oligonucleótido modificado liofilizado puede ser 25-800 mg de un oligonucleótido. 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. Además, en algunas realizaciones, el oligonucleótido modificado liofilizado es una cantidad de un oligonucleótido dentro de un intervalo seleccionado de 25 mg a 800 mg, 25 mg a 700 mg, 25 mg a 600 mg, 25 mg a 500 mg, 25 mg a 400 mg, 25 mg a 300 mg, 25 mg a 200 mg, 25 mg a 100 mg, 100 mg a 800 mg, 200 mg a 800 mg, 300 mg a 800 mg, 400 mg a 800 mg, 500 mg a 800 mg, 600 mg a 800 mg, 100 mg a 700 mg, 150 mg a 650 mg, 200 mg a 600 mg, 250 mg a 550 mg, 300 mg a 500 mg, 300 mg a 400 mg y 400 mg a 600 mg. El producto farmacológico liofilizado puede empaquetarse en un vial de vidrio transparente tipo I de 2 ml (tratado con sulfato de amonio), tapado con un cierre de goma de bromobutilo y sellado con un sello de aluminio FLIP-OFF®.

[0201] En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden contener adicionalmente otros componentes adjuntos que se encuentran convencionalmente en composiciones farmacéuticas, a sus niveles de uso establecidos en la técnica. Así, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos adicionales compatibles, tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles para formular físicamente diversas formas de dosificación de las composiciones., como colorantes, aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, espesantes y estabilizantes. Sin embargo, tales materiales, cuando se agregan, no deberían interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones. Las formulaciones pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, saborizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no lo hacen interactuar de manera nociva con los oligonucleótidos de la formulación.

[0202] Los restos lipídicos se han usado en terapias de ácido nucleico en una variedad de métodos. En un método, el ácido nucleico se introduce en liposomas o lipoplejos preformados hechos de mezclas de lípidos catiónicos y lípidos neutros. En otro método, los complejos de ADN con lípidos mono o policationicos se forman sin la presencia de un lípido neutro. En ciertas realizaciones, se selecciona un resto lipídico para aumentar la distribución de un agente farmacéutico a una célula o tejido particular. En ciertas realizaciones, se selecciona un resto lipídico para aumentar la distribución de un agente farmacéutico al tejido graso. En ciertas realizaciones, se selecciona un resto lipídico para aumentar la distribución de un agente farmacéutico al tejido muscular.

[0203] En ciertas realizaciones, INTRALIPID se usa para preparar una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido. Intralípido es una emulsión grasa preparada para administración intravenosa. Se compone de 10% de aceite de soja, 1,2% de fosfolípidos de yema de huevo, 2,25% de glicerina y agua para inyección. Además, se ha agregado hidróxido de sodio para ajustar el pH de modo que el rango de pH del producto final sea de 6 a 8,9.

[0204] En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende un compuesto de poliamina o un resto lipídico complejo con un ácido nucleico. En ciertas realizaciones, tales preparaciones comprenden uno o más compuestos que tienen cada uno individualmente una estructura definida por la fórmula (Z) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



en donde cada X^a y X^b , para cada aparición, es independientemente alquileo C_{1-6} ; n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; cada R es independientemente H, en donde al menos n + 2 de los restos R en al menos aproximadamente 80% de las moléculas del compuesto de fórmula (Z) en la preparación no son H; m es 1, 2, 3 o 4; Y es O, NR_2 , o S; R^1 es alquilo, alquenilo, o alquinilo; cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes; y R_2 es H, alquilo, alquenilo, o alquinilo; cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes; siempre que, si n = 0, al menos n + 3 de los restos R no sean H. Dichas preparaciones se describen en la publicación PCT WO/2008/042973. Ciertas preparaciones adicionales se describen en Akinc et al., Nature Biotechnology 26, 561 - 569 (01 de mayo de 2008).

[0205] En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento comprenden uno o más oligonucleótidos modificados y uno o más excipientes. En ciertas realizaciones de este tipo, los excipientes se seleccionan de agua, soluciones salinas, alcohol, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilasa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona.

[0206] En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica descrita en el presente documento se prepara usando técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, procesos de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o formación de tabletas.

5 **[0207]** En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica descrita en el presente documento es un líquido (por ejemplo, una suspensión, elixir y/o solución). En ciertas de tales realizaciones, se prepara una composición farmacéutica líquida usando ingredientes conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes y agentes colorantes.

10 **[0208]** En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica descrita en el presente documento es un sólido (por ejemplo, un polvo, tableta y/o cápsula). En ciertas de tales realizaciones, se prepara una composición farmacéutica sólida que comprende uno o más oligonucleótidos usando ingredientes conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, almidones, azúcares, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes y agentes desintegrantes.

15 **[0209]** En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica descrita en el presente documento se formula como una preparación de depósito. Ciertas preparaciones de depósito de este tipo son típicamente de acción más prolongada que las preparaciones no de depósito. En ciertas realizaciones, tales preparaciones se administran por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. En ciertas realizaciones, las preparaciones de depósito se preparan usando materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

20 **[0210]** En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende un sistema de administración. Los ejemplos de sistemas de administración incluyen, entre otros, liposomas y emulsiones. Ciertos sistemas de administración son útiles para preparar ciertas composiciones farmacéuticas que incluyen aquellas que comprenden compuestos hidrófobos. En ciertas realizaciones, se usan ciertos disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido.

25 **[0211]** En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende una o más moléculas de administración específicas de tejido diseñadas para administrar el uno o más agentes farmacéuticos de la presente divulgación a tejidos o tipos de células específicos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas incluyen liposomas recubiertos con un anticuerpo específico de tejido.

30 **[0212]** En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende un sistema de liberación sostenida. Un ejemplo no limitativo de dicho sistema de liberación sostenida es una matriz semipermeable de polímeros hidrófobos sólidos. En ciertas realizaciones, los sistemas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar agentes farmacéuticos durante un período de horas, días, semanas o meses.

35 **[0213]** En ciertas realizaciones, se prepara una composición farmacéutica para administración por inyección (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.). En ciertas de tales realizaciones, una composición farmacéutica comprende un vehículo y se formula en solución acuosa, tal como agua o tampones fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hanks, la solución de Ringer o el tampón salino fisiológico. En ciertas realizaciones, se incluyen otros ingredientes (por ejemplo, ingredientes que ayudan en la solubilidad o sirven como conservantes). En ciertas realizaciones, las suspensiones inyectables se preparan usando vehículos líquidos apropiados, agentes de suspensión y similares. Ciertas composiciones farmacéuticas para inyección se presentan en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis. 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 disolventes adecuados para su uso en composiciones farmacéuticas para inyección incluyen, pero no se limitan a, disolventes lipófilos y aceites grasos, tales como aceite de sésamo, ésteres de ácidos grasos sintéticos, como oleato o triglicéridos de etilo, y liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, como la carboximetilcelulosa de sodio, el sorbitol o el dextrano. Opcionalmente, tales suspensiones
40
45
50
55 también pueden contener estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los agentes farmacéuticos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

60 **[0214]** En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende un oligonucleótido modificado en una cantidad terapéuticamente eficaz. En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de una enfermedad o para prolongar la supervivencia del sujeto que está siendo tratado. La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de la capacidad de los expertos en la materia.

65 **[0215]** En ciertas realizaciones, uno o más oligonucleótidos modificados descritos en el presente documento se formulan como un profármaco. En ciertas realizaciones, tras la administración *in vivo*, un profármaco se convierte químicamente en la forma biológicamente, farmacéutica o terapéuticamente más activa de un oligonucleótido. En

ciertas realizaciones, los profármacos son útiles porque 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 la administración oral) que la forma activa correspondiente. En ciertos casos, un profármaco puede tener una solubilidad mejorada en comparación con la forma activa correspondiente. En ciertas realizaciones, los profármacos son menos solubles en agua que la forma activa correspondiente. En ciertos casos, dichos profármacos poseen una transmisión superior a través de las membranas celulares, donde la solubilidad en agua es perjudicial para la movilidad. En ciertas realizaciones, un profármaco es un éster. En ciertas de tales realizaciones, el éster se hidroliza metabólicamente a ácido carboxílico tras la administración. En ciertos casos, el compuesto que contiene ácido carboxílico es la forma activa correspondiente. En ciertas realizaciones, un profármaco comprende un péptido corto (poliaminoácido) unido a un grupo ácido. En ciertas de tales realizaciones, el péptido se escinde tras la administración para formar la forma activa correspondiente.

[0216] En ciertas realizaciones, se produce un profármaco modificando un compuesto farmacéuticamente activo de modo que el compuesto activo se regenerará tras la administración *in vivo*. El profármaco puede diseñarse para alterar la estabilidad metabólica o las características de transporte de un fármaco, para enmascarar 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 de los fármacos *in vivo*, los expertos en esta técnica, una vez que se conoce un compuesto farmacéuticamente activo, pueden diseñar profármacos del compuesto (véase, por ejemplo, Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, Nueva York, páginas 388-392).

Ciertas terapias adicionales

[0217] Los tratamientos para una enfermedad asociada con miR-21 pueden comprender más de una terapia. Como tal, en ciertas realizaciones descritas en el presente documento, se describen métodos para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad asociada con miR-21 que comprende administrar al menos una terapia además de administrar un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobase complementaria al microARN.

[0218] En ciertas realizaciones, la al menos una terapia adicional comprende un agente farmacéutico.

[0219] En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos incluyen agentes antiinflamatorios. En ciertas realizaciones, un agente antiinflamatorio es un agente antiinflamatorio esteroideo. En ciertas realizaciones, un agente antiinflamatorio esteroideo es un corticosteroide. En ciertas realizaciones, un corticosteroide es prednisona. En ciertas realizaciones, un agente antiinflamatorio es un medicamento antiinflamatorio no esteroideo. En ciertas realizaciones, un agente antiinflamatorio no esteroideo es ibuprofeno, un inhibidor de COX-I o un inhibidor de COX-2.

[0220] En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos incluyen agentes antidiabéticos. Los agentes antidiabéticos incluyen, pero no se limitan a, biguanidas, inhibidores de glucosidasa, insulinas, sulfonilureas y tiazolidendionas.

[0221] En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos incluyen, pero no se limitan a, diuréticos (por ejemplo, sprinonolactona, eplerenona, furosemida), inotrópicos (por ejemplo, dobutamina, milrinona), digoxina, vasodilatadores, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II (por ejemplo, son captopril, enalapril, lisinopril, benazepril, quinapril, fosinopril y ramipril), bloqueadores de los receptores de angiotensina II (ARB) (p. ej., candesartán, irbesartán, olmesartán, losartán, valsartán, telmisartán, eprosartán), bloqueadores de los canales de calcio, nitrato, isosorbato de dinitrato de hidrato, nitrato, isosorburo (p. ej. mononitrato de isosorbida, dinitrato de isosorbida), hidralazina, betabloqueantes (p. ej. carvedilol, metoprolol) y péptidos natriuréticos (p. ej. nesiritida). En ciertas realizaciones, un inhibidor de la ECA se selecciona de cilazapril, perindopril y trandolapril.

[0222] En ciertas realizaciones, se administra un inhibidor de la ECA a una dosis de 0,025 a 0,1 mg/kg de peso corporal. En ciertas realizaciones, se administra un inhibidor de la ECA a una dosis de 0,125 a 1,0 mg/kg de peso corporal. En ciertas realizaciones, se administra un inhibidor de la ECA a una dosis que varía de 1 a 6 mg/m²/día. En ciertas realizaciones, se administra un inhibidor de la ECA a una dosis que varía de 1 a 2 mg/m²/día. En ciertas realizaciones, se administra un inhibidor de la ECA a una dosis que varía de 2 a 4 mg/m²/día. En ciertas realizaciones, se administra un inhibidor de la ECA a una dosis que varía de 0,5 a 1 mg/m²/día.

[0223] En cierta realización, el ramipril se administra a una dosis que varía de 1 a 6 mg/m²/día. En ciertas realizaciones, ramipril se administra a una dosis que varía de 1 a 2 mg/m²/día. En cierta realización, enalapril se administra a una dosis que varía de 2 a 4 mg/m²/día. En cierta realización, lisinopril se administra a una dosis que varía de 4 a 8 mg/m²/día. En cierta realización, el benazepril se administra a una dosis que varía de 4 a 8 mg/m²/día. En cierta realización, fosinopril se administra a una dosis que varía de 4 a 8 mg/m²/día. En cierta realización, quinapril se administra a una dosis que varía de 4 a 8 mg/m²/día. En cierta realización, el cilazapril se administra a una dosis que varía de 1 a 2 mg/m²/día. En cierta realización, perinpril se administra a una dosis que varía de 1 a 2 mg/m²/día. En cierta realización, trandolapril se administra a una dosis que varía de 0,5 a 1 mg/m²/día.

[0224] En ciertas realizaciones, un ARB se administra a una dosis que varía de 6,25 a 150 mg/m²/día. En ciertas

realizaciones, se administra un ARB a una dosis de 6,25 mg/m²/día. En ciertas realizaciones, se administra un ARB a una dosis de 10 mg/m²/día. En ciertas realizaciones, se administra un ARB a una dosis de 12,5 mg/m²/día. En ciertas realizaciones, se administra un ARB a una dosis de 18,75 mg/m²/día. En ciertas realizaciones, se administra un ARB a una dosis de 37,5 mg/m²/día. En ciertas realizaciones, se administra un ARB a una dosis de 50 mg/m²/día. En ciertas realizaciones, se administra un ARB a una dosis de 150 mg/m²/día.

[0225] En ciertas realizaciones, losartán se administra a una dosis de 12,5 mg/m²/día. En ciertas realizaciones, losartán se administra a una dosis de 12,5 mg/m²/día. En ciertas realizaciones, candesartán se administra a una dosis de 6,25 mg/m²/día. En ciertas realizaciones, irbestartán se administra a una dosis de 37,5 mg/m²/día. En ciertas realizaciones, telmisartán se administra a una dosis de 10 mg/m²/día. En ciertas realizaciones, valsartán se administra a una dosis de 18,75 mg/m²/día. En ciertas realizaciones, el espresartán se administra a una dosis de 150 mg/m²/día.

[0226] En ciertas realizaciones, un agente farmacéutico es un antagonista de aldosterona. En ciertas realizaciones, un antagonista de la aldosterona es la espironolactona. En ciertas realizaciones, la espironolactona se administra a una dosis que varía de 10 a 35 mg diarios. En ciertas realizaciones, la espironolactona se administra a una dosis de 25 mg diarios.

[0227] En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos incluyen heparinoides. En ciertas realizaciones, un heparinoide es polisulfato de pentosano.

[0228] En ciertas realizaciones, un agente farmacéutico es un agente farmacéutico que bloquea una o más respuestas a señales fibrogénicas.

[0229] En ciertas realizaciones, un agente farmacéutico es una terapia de factor de crecimiento de tejido anti-conectivo. En ciertas realizaciones, una terapia anti-CTGF es un anticuerpo monoclonal contra CTGF.

[0230] En ciertas realizaciones, una terapia adicional puede ser un agente farmacéutico que mejora el sistema inmunitario del cuerpo, incluidas las dosis bajas de ciclofosfamida, timosimulina, vitaminas y suplementos nutricionales (p. ej., antioxidantes, incluidas las vitaminas A, C, E, betacaroteno, zinc, selenio, glutatión, coenzima Q-10 y equinácea) y vacunas, p. ej. el complejo inmunoestimulador (ISCOM), que comprende una formulación de vacuna que combina una presentación multimérica de antígeno y un adyuvante.

[0231] En ciertas realizaciones, la terapia adicional se selecciona para tratar o mejorar un efecto secundario de una o más composiciones farmacéuticas de la presente descripción. Tales efectos secundarios incluyen, sin limitación, reacciones en el lugar de inyección, anomalías en las pruebas de función hepática, anomalías en la función renal, toxicidad hepática, toxicidad renal, anomalías en el sistema nervioso central y miopatías. Por ejemplo, el aumento de los niveles de aminotransferasa en suero puede indicar toxicidad hepática o anomalía de la función hepática. Por ejemplo, el aumento de la bilirrubina puede indicar toxicidad hepática o anomalía de la función hepática.

[0232] Otros ejemplos de agentes farmacéuticos adicionales incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, que incluyen, pero no se limitan a inmunoglobulina intravenosa (IVIg); analgésicos (p. ej., paracetamol); salicilatos; antibióticos antivirales; agentes antifúngicos; modificadores adrenérgicos; hormonas (p. ej., esteroides anabólicos, andrógenos, estrógenos, calcitonina, progestina, somatostan y hormonas tiroideas); inmunomoduladores; relajantes musculares; antihistamínicos agentes de osteoporosis (por ejemplo, bifosfonatos, calcitonina y estrógenos); prostaglandinas, agentes antineoplásicos; agentes psicoterapéuticos; sedantes roble venenoso o productos de zumaque venenoso; anticuerpos; y vacunas.

Ciertos kits

[0233] La presente descripción también se refiere a kits. En algunas realizaciones, los kits comprenden uno o más compuestos de la descripción que comprenden un oligonucleótido modificado, en donde la secuencia de nucleobase del oligonucleótido es complementaria a la secuencia de nucleobase de miR-21. Los compuestos complementarios a miR-21 pueden tener cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos aquí. En algunas realizaciones, los compuestos complementarios a miR-21 pueden estar presentes dentro de un vial. Una pluralidad de viales, como 10, pueden estar presentes en, por ejemplo, envases dispensadores. En algunas realizaciones, el vial se fabrica para que sea accesible con una jeringa. El kit también puede contener instrucciones para usar los compuestos complementarios a miR-21.

[0234] En algunas realizaciones, los kits se pueden usar para la administración del compuesto complementario a miR-21 a un sujeto. En tales casos, además de los compuestos complementarios a miR-21, el kit puede comprender además uno o más de los siguientes: jeringa, hisopo con alcohol, algodón y/o gasa. En algunas realizaciones, los compuestos complementarios a miR-21 pueden estar presentes en una jeringa precargada (como una jeringa de dosis única con, por ejemplo, una aguja de calibre 27, ½ pulgada con un protector de aguja), en lugar de un frasco. Una pluralidad de jeringas precargadas, como 10, puede estar presente en, por ejemplo, envases dispensadores. El kit también puede contener instrucciones para administrar los compuestos complementarios a miR-21.

Ciertos modelos experimentales

[0235] En ciertas realizaciones, aquí se describen métodos para usar y/o probar oligonucleótidos modificados de la presente descripción en un modelo experimental. Los expertos en la materia pueden seleccionar y modificar los protocolos para tales modelos experimentales para evaluar un agente farmacéutico como se describe en este documento.

[0236] Generalmente, los oligonucleótidos modificados se prueban primero en células cultivadas. Los tipos celulares adecuados incluyen aquellos que están relacionados con el tipo celular al que se desea la administración *in vivo* de un oligonucleótido modificado. Por ejemplo, los tipos de células adecuadas para el estudio de los métodos descritos en el presente documento incluyen células primarias o cultivadas.

[0237] En ciertas realizaciones, el grado en que un oligonucleótido modificado interfiere con la actividad de miR-21 se evalúa en células cultivadas. En ciertas realizaciones, la inhibición de la actividad de microARN puede evaluarse midiendo los niveles del microARN. Alternativamente, se puede medir el nivel de una transcripción regulada por microARN predicha o validada. Una inhibición de la actividad de microARN puede dar como resultado un aumento en la transcripción regulada por miR-21 y/o la proteína codificada por la transcripción regulada por miR-21. Además, en ciertas realizaciones, se pueden medir ciertos resultados fenotípicos.

[0238] Varios modelos animales están disponibles para el artesano experto para el estudio de miR-21 en modelos de enfermedad humana. Por ejemplo, los inhibidores de miR-21 pueden ser estudiados en un modelo experimental de síndrome de Alport, por ejemplo ratones knockout *COL4A3* (ratones *COL4A3*^{-/-}). La gravedad de la enfermedad en el modelo de ratón depende del fondo genético del ratón que porta la mutación *Col4a3*. Por ejemplo, el inicio y la progresión de la enfermedad son generalmente más rápidos en el 129X1/SvJ en relación con el fondo C57BL/6J. En consecuencia, el fondo genético del ratón *Col4a3*^{-/-} puede seleccionarse para variar el inicio y la progresión de la enfermedad. Los modelos adicionales incluyen modelos caninos del síndrome de Alport Xlinked, autosómico recesivo o autosómico dominante. Ver, por ejemplo, Kashtan, Nephrol. Marcar. Transplant, 2002, 17: 1359-1361.

Ciertos ensayos de cuantificación

[0239] Los efectos de la inhibición antisentido de miR-21 después de la administración de oligonucleótidos modificados pueden evaluarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones, estos métodos se usan para cuantificar los niveles de microARN en células o tejidos *in vitro* o *in vivo*. En ciertas realizaciones, los cambios en los niveles de microARN se miden mediante análisis de micromatrices. En ciertas realizaciones, los cambios en los niveles de microARN se miden mediante uno de varios ensayos de PCR disponibles comercialmente, tales como el ensayo de microARN TaqMan® (Applied Biosystems). En ciertas realizaciones, la inhibición antisentido de miR-21 se evalúa midiendo el nivel de ARNm y/o proteína de una diana de miR-21. La inhibición antisentido de miR-21 generalmente da como resultado un aumento en el nivel de ARNm y/o proteína de una diana del microARN.

Ensayo de compromiso de diana

[0240] La modulación de la actividad de microARN con un mimico anti-miR o microARN puede evaluarse midiendo el compromiso de diana. En ciertas realizaciones, el compromiso de la diana se mide mediante un perfil de micromatrices de ARNm. Se buscan secuencias de semillas de microARN en las secuencias de los ARNm que son moduladas (aumentadas o disminuidas) por la imitación de anti-miR o microARN, para comparar la modulación de ARNm que son dianas del microARN con la modulación de ARNm que no son dianas de microARN. De esta manera, se puede evaluar la interacción del anti-miR con miR-21, o miR-21 mimico con sus dianas. En el caso de un anti-miR, los ARNm cuyos niveles de expresión aumentan se seleccionan para las secuencias de ARNm que comprenden una coincidencia de semillas con el microARN al que el anti-miR es complementario.

EJEMPLOS

[0241] Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente algunas realizaciones de la invención. Sin embargo, de ninguna manera deben interpretarse como limitantes del alcance de las reivindicaciones. Los expertos en la materia adoptarán fácilmente los principios subyacentes de este descubrimiento para diseñar diversos compuestos sin apartarse del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1: Anti-miR-21 en un modelo de Síndrome de Alport

[0242] Los ratones *Col4a3*^{-/-} en el fondo genético 129sv desarrollan espontáneamente una enfermedad renal grave similar al Síndrome de Alport humano. Como tal, los ratones *Col4a3*^{-/-} se usan como modelo experimental del síndrome de Alport.

[0243] Los oligonucleótidos modificados (compuestos anti-miR-21) complementarios para miR-21 se ensayaron en el modelo *Col4a3*^{-/-} de síndrome de Alport. Se usaron ratones de tipo salvaje como ratones de control.

[0244] La estructura del compuesto de anti-miR-21 es 5'-AECsATCsAGTCsTGAUsAAGCsTAε-3' (SEQ ID NO: 3), donde nucleósidos no seguidos por un subíndice indican β-D-desoxirribonucleósidos; los nucleósidos seguidos de un subíndice "E" indican nucleósidos 2'-MOE; los nucleósidos seguidos de un subíndice "S" indican nucleósidos S-cEt. Cada enlace internucleosídico es un enlace internucleósido fosforotioato.

[0245] A las 3 semanas de edad, los ratones se genotiparon para identificar ratones *Col4a3*^{-/-}. Desde las 3 semanas de edad hasta las 9 semanas de edad, los compañeros de camada de ratones de sexo coincidente fueron tratados con anti-miR-21 o PBS. Anti-miR-21 se administró por vía subcutánea a una dosis de 25 mg/kg, dos veces por semana. Los grupos de tratamiento fueron: (1) ratones de tipo salvaje, administración de PBS, n = 8; (2) ratones *Col4a3*^{-/-}, administración de PBS, n = 12; (3) ratones *Col4a3*^{-/-}, administración anti-miR-21, n = 12. Se usaron camadas salvajes de ratones *Col4a3*^{-/-} como ratones de control de tipo salvaje. Se recogió una muestra de orina durante la noche (aproximadamente 16 horas) semanalmente. Se recolectaron plasma y riñones al final de la semana 9. Se analizaron muestras de líquidos y tejidos para determinar los cambios en la función renal, daño renal y esclerosis glomerular y fibrosis intersticial.

[0246] Los puntos finales en sangre u orina incluyeron la medición de nitrógeno ureico en sangre (BUN), albuminuria, relación albúmina/creatinina, tasa de filtración glomerular. El análisis histológico incluyó la evaluación de la esclerosis glomerular, la fibrosis intersticial, la lesión de los túbulos, la infiltración de macrófagos y la presencia de miofibroblastos.

[0247] El nitrógeno ureico en sangre (BUN) se midió en la semana 9. La significación estadística se calculó mediante la prueba de Mann Whitney. Como se muestra en la Figura 1A, se observó una reducción estadísticamente significativa en BUN en animales tratados con anti-miR-21, en relación con los animales de control tratados con PBS al final del estudio. El BUN reducido se observó en general (Figura 1A), así como solo en ratones machos (aproximadamente 90 mg/dL en comparación con aproximadamente 25 mg/dL en ratones de control machos) y solo en ratones hembras (aproximadamente 70 mg/dL en comparación con aproximadamente 25 mg/dL en ratones hembra de control) (no se muestra). El BUN en ratones *Col4a3*^{+/+} fue de aproximadamente 12,5 mg/dL (dentro de los límites normales; no se muestra). BUN es un marcador sanguíneo de la función renal. Mayor BUN se correlaciona con una función renal más pobre. Una reducción en BUN es un indicador de daño y daño renal reducido y una función mejorada.

[0248] La albuminuria se evaluó midiendo la albúmina en muestras de orina, recogidas durante 16 horas con una frecuencia de una vez por semana, mediante ELISA y normalizando a la excreción urinaria de creatinina. Todos los análisis se realizaron al mismo tiempo al final del estudio. Como se muestra en la Figura 1B, los ratones *Col4a3*^{-/-} desarrollan albuminuria severa. Sin embargo, los ratones tratados con anti-miR-21 desarrollaron mucha menos albuminuria detectada por una reducción en la proporción de albúmina urinaria a creatinina. Esta reducción se observó en la semana 7 y persistió hasta la semana 9. Compañeros de camada de tipo salvaje de ratones *Col4a3*^{-/-} no mostraron albuminuria, como se esperaba. La albuminuria es una medida sensible del daño glomerular y tubular. Una reducción en la proporción de albúmina a creatinina indica una reducción en la enfermedad glomerular y/o tubular.

[0249] El Síndrome de Alport también se caracteriza por el desarrollo progresivo de la glomeruloesclerosis y la fibrosis renal intersticial significativa que se produce cuando se produce una fuga glomerular inapropiada. En consecuencia, la glomeruloesclerosis se evaluó mediante la puntuación cegada de los glomérulos para las lesiones escleróticas (pérdida del asa capilar + fibrosis o hialinosis). Treinta glomérulos fueron puntuados secuencialmente de cada ratón por un observador cegado. El puntaje fue de 0-4 donde 0 = normal; 1 = <25% del glomérulo afectado por esclerosis; 2 = 25-50% del glomérulo se ve afectado por la esclerosis; 3 = 50-75% del glomérulo se ve afectado por la esclerosis; 4 = 75-100% del glomérulo se ve afectado por la esclerosis. La proporción de glomérulos sin enfermedad fue mucho mayor en ratones tratados con anti-miR-21 y la proporción de glomérulos con glomérulos afectados moderada o severamente (puntuación 2-4) fue significativamente mayor en los ratones tratados con PBS (Figura 2). Los glomérulos también se puntuaron en compañeros de camada de tipo salvaje (WT) de ratones *Col4a3*^{-/-}. La fibrosis intersticial se midió morfométricamente en secciones sagitales enteras teñidas con rojo Picrosirius de animales tratados con PBS y anti-miR-21 *Col4a3*^{-/-}. Como se muestra en la Figura 3A, se observó una reducción estadísticamente significativa en la fibrosis intersticial en los ratones *Col4a3*^{-/-} tratados con anti-miR-21. Además, la PCR cuantitativa para las transcripciones de la principal proteína de la matriz patológica Colágeno I α1 (COL1A1) mostró que el tejido renal de ratones *Col4a3*^{-/-} tratados con anti-miR-21 mostró mucho menos producción de este colágeno patológico (Figura 3B).

[0250] La lesión del tejido renal se evaluó en secciones de tejido fijadas con parafina y paraformaldehído (4%) teñidas por la reacción periódica de ácido-Schiff (PAS). Inicialmente, las secciones de riñón se clasificaron para la lesión general según el túbulo y la lesión e inflamación glomerular. El daño se evaluó en función de una variedad de factores que incluyen dilatación de los túbulos, pérdida del borde en cepillo, infiltración celular, inflamación glomerular, edema intersticial y necrosis celular. Las secciones de riñón se clasificaron de forma cegada para la lesión general y se les asignó una puntuación de clasificación de lesión renal. Las secciones de riñón de ratones *Col4a3*^{-/-} mostraron un puntaje de rango de lesión renal significativamente menor, lo que indica una menor lesión renal (Figura 4A). Para analizar esto con más detalle, los glomérulos fueron evaluados por un observador cegado para la proporción que tenía medias lunas glomerulares. La media luna es una proliferación de células dentro de la cápsula de Bowman, se define por ≥ 2 capas de células dentro del espacio de Bowman. La media luna es un marcador bien establecido de lesión glomerular. En los ratones *Col4a3*^{-/-} que recibieron anti-miR-21, la proporción de glomérulos con crecientes fue de aproximadamente el 44%, mientras que en los ratones que recibieron el tratamiento de control PBS, la proporción de

glomérulos con crecientes fue de aproximadamente el 19% (Figura 4B). En camadas *Col4a3+/+*, la proporción de glomérulos con crecientes fue inferior al 5% (no se muestra). Los túbulos de las nefronas del riñón también son un sitio de daño. El daño del túbulo se evaluó superponiendo una cuadrícula sobre imágenes secuenciales que cubren la sección sagital completa de cada riñón. De manera ciega, se evaluó el daño de los túbulos en cada cuadrado de la cuadrícula. El daño tubular se evaluó en función de la presencia de dilatación/aplanamiento de los túbulos, pérdida del borde en cepillo, infiltración celular y necrosis celular. La presencia de estas características da como resultado una puntuación positiva para ese cuadrado en la cuadrícula. Se aplica una puntuación general a cada imagen, que es el % de cuadrados que tienen daño en los túbulos. Esto se promedia para todas las imágenes de ese riñón. El puntaje promedio para cada riñón se somete a análisis estadístico. Como se muestra, la puntuación de lesión del túbulo fue significativamente menor en los ratones *Col4a3-/-* tratados con anti-miR-21, en relación con el PBS que recibió *Col4a3-/-* (Figura 4C). El puntaje de lesión del túbulo en camadas *Col4a3+/+* fue inferior al 10% (no se muestra).

[0251] Se realizó un análisis histológico adicional de muestras de riñón para evaluar la infiltración de macrófagos, estabilidad endotelial, y la deposición de miofibroblastos. Según lo juzgado por la tinción F4/80, la infiltración de macrófagos se redujo en ratones *Col4a3-/-* tratados con anti-miR-21 en comparación con ratones de control *Col4a3-/-* tratados con PBS (Figura 5A). La tinción inmunocitoquímica para CD31 demostró una mejora en la estabilidad endotelial en ratones *Col4a3-/-* tratados con anti-miR-21 en comparación con ratones de control *Col4a3-/-* tratados con PBS (no mostrados). La detección de alfa-SMA reveló una reducción en la deposición de miofibroblastos en ratones *Col4a3-/-* tratados con anti-miR-21 en comparación con el control *Col4a3-/-* tratado con ratones PBS (Figura 5B). En ratones *Col4a3+/+*, la tinción de alfa-SMA fue aproximadamente del 5% (no se muestra).

[0252] Las especies de oxígeno reactivas (ROS) son un subproducto del metabolismo celular normal. Durante el estrés celular, el exceso de ROS puede causar la peroxidación lipídica de las membranas celulares y orgánulos, lo que resulta en la interrupción de la integridad estructural y la capacidad para el transporte celular y la producción de energía. En el riñón, los ROS producidos durante el estrés celular pueden causar daño renal. Para evaluar si la generación de ROS se redujo después de la inhibición de miR-21 en ratones *Col4a3-/-*, se midieron los niveles de peróxido de hidrógeno en orina en ratones anti-miR-21 y tratados con PBS. Los niveles de peróxido de hidrógeno en orina se redujeron significativamente en ratones que recibieron anti-miR-21 (Figura 6A). En ratones *Col4a3+/+*, los niveles urinarios de peróxido de hidrógeno fueron inferiores a 5 μ M (no se muestra). Además, la tinción inmunocitoquímica de tejido renal con dihidroetidio (DHE), que es una medida de ROS, demostró una reducción en ROS en el tejido renal de ratones *Col4a3-/-* tratados con anti-miR-21 en comparación con ratones de control tratados con PBS (Figura 6B). En ratones *Col4a3+/+*, se observó una tinción de DHE inferior al 10% (no mostrada). Estos datos demuestran la reducción de ROS tanto en la orina como en el tejido renal en ratones *Col4a3-/-* tratados con anti-miR-21. En consecuencia, un mecanismo por el cual anti-miR-21 puede reducir la lesión renal puede incluir una reducción en la generación de especies reactivas de oxígeno.

[0253] La inmunotransferencia de proteínas en los riñones de ratones *Col4a3-/-* tratados con anti-miR-21 reveló un aumento en la cantidad de proteína MPV17L en el riñón, en relación con los ratones *Col4a3-/-*. MPV17L es una proteína mitocondrial de la membrana interna que está implicada en el metabolismo de las especies reactivas de oxígeno y protege contra el estrés oxidativo. En consecuencia, la generación reducida de ROS después del tratamiento con anti-miR-21 puede ocurrir al menos en parte debido al aumento de los niveles de MPV17L. Para explorar más a fondo los efectos mecanicistas de anti-miR-21, la proteína PPAR-alfa se midió por inmunotransferencia de los riñones de ratones *Col4a3-/-* tratados con PBS o tratamiento anti-miR-21. El tratamiento anti-miR-21 aumentó la proteína PPAR-alfa, lo que sugiere una estimulación de las vías metabólicas.

[0254] Los podocitos son células epiteliales altamente especializadas que son un componente esencial de la barrera de filtración glomerular. La pérdida de podocitos puede conducir a proteinuria, y en algunos estados de enfermedad a esclerosis glomerular. Para evaluar si el número de podocitos se vio afectado por la inhibición de miR-21 en ratones *Col4a3-/-*, se midió el número de podocitos en ratones tratados con anti-miR-21 y tratados con PBS. El número de podocitos aumentó significativamente en los ratones *Col4a3-/-* que recibieron anti-miR-21, en relación con los ratones tratados con PBS, y fue comparable al número de podocitos observado en los compañeros de camada de tipo salvaje de ratones *Col4a3-/-* (Figura 7). En consecuencia, un mecanismo por el cual anti-miR-21 puede reducir la lesión renal en un modelo de Síndrome de Alport es prevenir o reducir la pérdida de podocitos.

[0255] Un estudio similar se llevó a cabo usando los siguientes compuestos anti-miR-21:

compuesto anti-miR-21 n° 1 (arriba): 5'-AECsATCsAGTCsTGAUsAAGCsTAE-3' (SEQ ID NO: 3)
 compuesto anti-miR-21 n° 2: 5'-AECsATCsAsGTCsUsGAUsAsAGCsUSAE-3' (SEQ ID NO: 3);
 compuesto anti-miR-21 n° 3: 5'-^{Me}CEAsAsTECsUsAEAEUsAsAEgECsTEAs-3' (SEQ ID NO: 4); y
 compuesto anti-miR-21 n° 4: 5'-AECsAETECsAEgETECsTGAUsAAGCsUsAs-3' (SEQ ID NO: 3); donde los nucleósidos no seguidos por un subíndice indican β -D-desoxirribonucleósidos; los nucleósidos seguidos de un subíndice "E" indican nucleósidos 2'-MOE; los nucleósidos seguidos de un subíndice "S" indican nucleósidos de S-cEt; y un superíndice "Me" indica un grupo 5-metilo en la base del nucleósido. Cada enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico fosforotioato.

[0256] Cada compuesto se administró a ratones *Col4a3-/-* de tres semanas de edad a una dosis de 25 mg/kg, dos

veces por semana, durante nueve semanas. Los grupos de control incluyeron ratones Col4a3^{-/-} tratados con PBS y compañeros de camada de tipo salvaje de ratones Col4a3^{-/-}. Cada grupo de tratamiento contenía de 10 a 12 ratones. Para los compuestos n° 1, 2 y 4, los puntos finales se evaluaron como se describió anteriormente e incluyeron BUN, proporción de albúmina urinaria a creatinina, daño renal (tinción de PAS), glomeruloesclerosis y proporción de glomérulos con crecientes. Para el compuesto n° 3, los puntos finales incluyeron BUN, proporción de albúmina urinaria a creatinina y expresión génica de colágeno (como una medida de fibrosis), evaluada como se describió anteriormente.

[0257] De acuerdo con los resultados descritos anteriormente, el compuesto anti-miR-21 n° 1 mejoró todos los puntos finales evaluados. La eficacia de ambos compuestos anti-miR-21 n° 2 fue similar a la del compuesto n° 1, con mejoras observadas en BUN, proporción de albúmina urinaria a creatinina, daño renal, extensión de la glomeruloesclerosis y porcentaje de glomérulos con crecientes. La eficacia del compuesto n° 3 fue similar a la del compuesto n° 1, con mejoras en el BUN, la proporción de albúmina urinaria a creatinina y la expresión de Col1a1. El compuesto anti-miR-21 n° 4, aunque es menos eficaz que los compuestos de los otros compuestos probados, aún dio como resultado mejoras en BUN, daño renal, extensión de la glomeruloesclerosis y porcentaje de glomérulos con crecientes.

[0258] Tomados en conjunto, estos datos ilustran que en un modelo de Alport Syndrome, el tratamiento anti-miR-21 atenuó la pérdida de la función renal y el desarrollo de albuminuria. La glomeruloesclerosis y la fibrosis intersticial se atenuaron notablemente y se preservaron los túbulos proximales. Como anti-miR-21 previene la pérdida progresiva de la función renal en el ratón Col4a3^{-/-} y atenúa la enfermedad glomerular y tubulointersticial, anti-miR-21 es un agente terapéutico para el Síndrome de Alport humano.

Ejemplo 2: Elevación de miR-21 en un modelo de síndrome de Alport

[0259] Para evaluar la desregulación de miR-21 en un modelo experimental de síndrome de Alport, Los niveles de miR-21 se midieron en tejido renal recogido de ratones. Se aisló el ARN del riñón completo y se midió miR-21 por PCR cuantitativa. En ratones Col4a3^{-/-}, los niveles de miR-21 se elevaron aproximadamente tres veces en relación con los niveles de miR-21 en ratones de tipo salvaje.

[0260] En consecuencia, un sujeto que recibe tratamiento para el Síndrome de Alport puede identificarse por tener miR-21 elevado en material de biopsia renal, orina o sangre, antes de la administración del tratamiento.

Ejemplo 3: Estudios de supervivencia en un modelo de síndrome de Alport

[0261] Los ratones de tipo salvaje generalmente viven de 2 a 3 años (o de 730 a 1095 días). En ratones Col4a3^{-/-} en un fondo 129X1/SvJ, la insuficiencia renal en etapa terminal puede ocurrir tan pronto como a los 2 meses de edad. En Col4a3^{-/-} en un fondo C57BL/6J, la insuficiencia renal en etapa terminal puede ocurrir tan pronto como a los 6 meses de edad. Independientemente de los antecedentes, la vida útil de los ratones Col4a3^{-/-} es significativamente más corta que la de los ratones de tipo salvaje. Como tal, los ratones Col4a3^{-/-}, en cualquier contexto genético, pueden servir como modelo para la insuficiencia renal terminal en el síndrome de Alport y pueden usarse para evaluar los efectos de los agentes terapéuticos candidatos en la esperanza de vida.

[0262] Los ratones se genotipan para identificar ratones Col4a3^{-/-}. Anti-miR-21 se administra por vía subcutánea en una dosis que varía de 10 a 25 mg/kg, una o dos veces por semana durante hasta un año. PBS puede administrarse como un tratamiento de control. Se recogen muestras de orina durante la noche (aproximadamente 16 horas) en un horario semanal o mensual durante todo el estudio. Se registra la edad de cada ratón al morir. El plasma y los riñones se recogen al morir o al final del estudio. Se analizan muestras de líquidos y tejidos para determinar los cambios en la función renal, la esclerosis glomerular y la fibrosis.

[0263] Se analizan muestras de fluidos y tejidos para determinar cambios en la función renal, daño renal y esclerosis glomerular y fibrosis intersticial. Los puntos finales en sangre u orina incluyen la medición de nitrógeno ureico en sangre (BUN), albuminuria, proporción de albúmina/creatinina, tasa de filtración glomerular. El análisis histológico incluye la evaluación de la esclerosis glomerular, la fibrosis intersticial, la lesión de los túbulos, la infiltración de macrófagos y la presencia de miofibroblastos.

[0264] Se observa un retraso en la aparición de insuficiencia renal en etapa terminal y una mayor esperanza de vida en ratones tratados con anti-miR-21, en relación con los ratones de control tratados con PBS, lo que sugiere que anti-miR-21 es un agente terapéutico que puede aumentar la esperanza de vida de los sujetos con síndrome de Alport.

Anti-miR-21 aumenta la supervivencia en un modelo de estudio de dosis única del síndrome de Alport

[0265] Para evaluar los efectos de anti-miR-21 sobre la supervivencia en un modelo experimental de síndrome de Alport, se administró el compuesto anti-miR-21 a ratones Col4a3^{-/-}.

[0266] La estructura del compuesto anti-miR-21 es 5'-AECsATCsAGTCsTGAUsAAGCsTAE-3' (SEQ ID NO: 3), donde nucleósidos no seguidos por un subíndice indican β-D-desoxirribonucleósidos; los nucleósidos seguidos de un subíndice "E" indican nucleósidos 2'-MOE; los nucleósidos seguidos de un subíndice "S" indican nucleósidos S-cEt.

Cada enlace internucleosídico es un enlace internucleósido fosforotioato.

[0267] Se cruzaron ratones *Col4a3*^{+/1} (heterocigotos) sobre un fondo 129X1/SvJ para generar ratones *Col4a3*^{-/-}. A las 3 semanas de edad, los ratones fueron genotipados para identificar ratones *Col4a3*^{-/-}. Los grupos de tratamiento fueron: (1) ratones *Col4a3*^{+/+} (camada de tipo salvaje), administración de PBS, dos veces por semana, n = 12; (2) ratones *Col4a3*^{-/-}, administración de PBS, dos veces por semana, n = 12; (3) ratones *Col4a3*^{-/-}, 25 mg/kg de administración anti-miR-21 por vía subcutánea, dos veces por semana, n = 12. Los tratamientos se administraron dos veces por semana, desde la semana 3 hasta la semana 16. Se midieron los pesos de los animales semanalmente, y se midió la vida útil.

[0268] Como se esperaba, los ratones *Col4a3*^{-/-} experimentaron una pérdida de peso que comenzó alrededor de las 9 semanas de edad, y la muerte se produjo entre las 9 y 11 semanas de edad. Como se muestra en la Figura 8A, anti-miR-21 aumentó el peso corporal máximo y retrasó significativamente la pérdida de peso (p < 0,01). Como se muestra en la Figura 8B, anti-miR-21 aumentó significativamente la vida útil (p < 0,001). Por lo tanto, el tratamiento con anti-miR-21 no solo retrasó la pérdida de peso, sino que mejoró significativamente la supervivencia de los ratones *Col4a3*^{-/-}.

Anti-miR-21 aumenta la supervivencia en un modelo de estudio de respuesta a la dosis del síndrome de Alport

[0269] Para evaluar los efectos sensibles a la dosis de anti-miR-21 sobre la supervivencia en un modelo experimental de síndrome de Alport, varias dosis de compuestos anti-miR-21 se administraron a ratones *Col4a3*^{-/-}.

[0270] La estructura del compuesto anti-miR-21 es 5'-AECsATCsAGTCsTGAUsAAGCsTAE-3' (SEQ ID NO: 3), donde nucleósidos no seguidos por un subíndice indican β-D-desoxirribonucleósidos; los nucleósidos seguidos de un subíndice "E" indican nucleósidos 2'-MOE; los nucleósidos seguidos de un subíndice "S" indican nucleósidos S-cEt. Cada enlace internucleosídico es un enlace internucleósido fosforotioato.

[0271] A las 3 semanas de edad, los ratones se genotiparon para identificar ratones *Col4a3*^{-/-}. Los grupos de tratamiento fueron:

- (1) ratones *Col4a3*^{-/-}, administración de PBS una vez por semana, n = 13;
- (2) ratones *Col4a3*^{-/-}, administración de 12,5 mg/kg anti-miR-21, una vez por semana, n = 12;
- (3) ratones *Col4a3*^{-/-}, administración de 25 mg/kg anti-miR-21, una vez a la semana, n = 13;
- (4) ratones *Col4a3*^{-/-}, 50 mg/kg de administración anti-miR-21, una vez por semana, n = 12;
- (5) ratones *Col4a3*^{-/-}, administración de 25 mg/kg anti-miR-21, dos veces por semana, n = 12;

[0272] Los tratamientos se administraron a partir del día 24. Los pesos de los animales se midieron semanalmente y se registró la vida útil. En la semana 7, se recogió sangre para medir el BUN.

[0273] Como se muestra en la Figura 9A, se observó una reducción en BUN en animales tratados con anti-miR-21, en relación con los animales de control tratados con PBS. Aunque se observó una reducción en BUN, no fue fuertemente sensible a la dosis, quizás debido al hecho de que la enfermedad fue más grave en los ratones *Col4a3*^{-/-} utilizados para este experimento (los ratones se obtuvieron de un proveedor diferente a ratones *Col4a3*^{-/-} descritos en los ejemplos anteriores). La reducción observada en BUN es un indicador de daño y daño renal reducido y una función mejorada.

[0274] Como se muestra en la Figura 9B, el tratamiento con anti-miR-21 aumentó la vida útil de los ratones *Col4a3*^{-/-} de una manera sensible a la dosis. El aumento de la vida útil se observó para los tratamientos dos veces por semana y una vez por semana. La mediana de supervivencia fue la siguiente: PBS, 62 días; 12,5 mg/kg anti-miR-21 una vez por semana (QW), 72,5 días; 25 mg/kg anti-miR-21 una vez por semana (QW), 77 días; 50 mg/kg anti-miR-21 una vez por semana (QW), 89 días; 25 mg/kg anti-miR-21 dos veces por semana (BIW), 82,5 días.

[0275] Se observó un retraso en la aparición de disfunción renal y una mayor esperanza de vida en ratones tratados con anti-miR-21, en relación con los ratones de control tratados con PBS, lo que sugiere que anti-miR-21 es un agente terapéutico que puede aumentar la vida expectativa de sujetos con síndrome de Alport.

Ejemplo 4: Distribución anti-miR en el riñón de ratones *Col4a3*^{-/-}

[0276] Se sabe que los oligonucleótidos, incluidos los compuestos anti-miR, se distribuyen a varios tipos de células dentro del riñón. Según lo informado por Chau et al., Sci Transl Med., 2012, 121ra18, después de la administración de un anti-miR marcado con Cy3 a ratones normales o ratones sometidos a lesión renal (obstrucción ureteral unilateral, un modelo de fibrosis intersticial), la mayor intensidad de fluorescencia en el riñón fue en el epitelio del túbulo proximal. El endotelio, los pericitos, los miofibroblastos y los macrófagos también contenían cantidades detectables de anti-miR marcado con Cy3. Sin embargo, el glomérulo, en particular los podocitos, no parecía absorber cantidades significativas de anti-miR consistentes con la distribución conocida de oligonucleótidos químicamente modificados (Masarjian et al., Oligonucleotides, 2004, 14, 299-310).

[0277] Para investigar la distribución de anti-miR en un modelo de ratón con síndrome de Alport, se administró el compuesto anti-miR marcado con Cy3 a dos grupos diferentes de ratones *Col4a3*^{-/-}, uno a las 6 semanas de edad (n = 3) y uno a las 8 semanas de edad (n = 4) y a un grupo de ratones de tipo salvaje a las 8 semanas de edad (n = 3). Dos días después de la administración del compuesto anti-miR, se sacrificaron los animales y se recogieron los riñones y se procesaron para el análisis histológico.

[0278] Secciones de tejido renal se marcaron conjuntamente con anticuerpos específicos para varios marcadores celulares diferentes para identificar la captación anti-miR en tipos de células particulares. La tinción se realizó para alfa-SMA (un marcador de miofibroblastos), PDGFR-beta (un marcador de pericito/miofibroblastos), CD31 (un marcador de células endoteliales), F4/80 (un marcador de macrófagos) y GP38 (un marcador de podocitos). Como se esperaba, el compuesto anti-miR se absorbió en el epitelio del túbulo proximal, pericitos, miofibroblastos y macrófagos. A diferencia de las observaciones previas en ratones normales y ratones con fibrosis intersticial, en los ratones *Col4a3*^{-/-} anti-miR se absorbió en el glomérulo, incluidos los podocitos.

[0279] Como se describe en el presente documento, la eficacia observada después de la administración de anti-miR-21 en un modelo experimental de síndrome de Alport se acompaña de mejoras no solo en la fibrosis intersticial que rodea los túbulos sino también en la fibrosis de los glomérulos (conocida como glomeruloesclerosis). Estos datos sugieren que esas mejoras pueden estar directamente relacionadas con los efectos anti-miR-21 en los glomérulos, además de o en lugar de la retroalimentación de una estructura y función mejorada del túbulo.

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 25 nucleósidos unidos, para usar en un método de tratamiento del Síndrome de Alport que comprende administrar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene el Síndrome de Alport el oligonucleótido modificado, en donde la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es complementaria a miR-21.
2. El oligonucleótido modificado para uso de la reivindicación 1, en donde (i) al sujeto se le ha diagnosticado síndrome de Alport antes de administrar el oligonucleótido modificado, o (ii) se determinó que el sujeto, antes de la administración del oligonucleótido modificado, tenía un aumento del nivel de miR-21 en el riñón, la orina o la sangre del sujeto.
3. El oligonucleótido modificado para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la administración:
- a. mejora la función renal;
 - b. retrasa el inicio de la enfermedad renal en etapa terminal;
 - c. retrasa el tiempo de diálisis;
 - d. retrasa el tiempo de trasplante renal; y/o
 - e. mejora la esperanza de vida.
4. El oligonucleótido modificado para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la administración:
- a. reduce la hematuria;
 - b. retrasa la aparición de hematuria;
 - c. reduce la proteinuria;
 - d. retrasa la aparición de proteinuria;
 - e. reduce la fibrosis renal;
 - f. ralentiza la progresión de la fibrosis; y/o
 - g. detiene la progresión de la fibrosis.
5. El oligonucleótido modificado para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sujeto:
- (i) tiene una mutación seleccionada de una mutación en el gen que codifica la cadena alfa 3 del colágeno tipo IV, una mutación en el gen que codifica el alfa 4 cadena de colágeno tipo IV, o una mutación en el gen que codifica la cadena alfa 5 del colágeno tipo IV;
 - (ii) es macho;
 - (iii) es hembra;
 - (iv) se identifica con hematuria y/o proteinuria;
 - (v) tiene una función renal reducida; y/o
 - (vi) necesita una mejor función renal.
6. El oligonucleótido modificado para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:
- a. medir el nitrógeno ureico en sangre en la sangre del sujeto;
 - b. medir la creatinina en la sangre del sujeto;
 - c. medir el aclaramiento de creatinina en el sujeto;
 - d. medir proteinuria en el sujeto;
 - e. medir de la relación albúmina: creatinina en el sujeto;
 - f. medir la tasa de filtración glomerular en el sujeto;
 - g. medir la cistatina C en el sujeto;
 - h. medir proteína de traza β en la sangre del sujeto;
 - i. medir 2-microglobulina en la sangre del sujeto;
 - j. medir la proteína N-acetil- β -D-glucosaminidasa en la orina del sujeto;
 - k. medir la proteína lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos en la orina del sujeto;
 - l. medir la proteína de la molécula 1 de lesión renal en la orina del sujeto;
 - m. medir la proteína interleucina-18 en la orina del sujeto;
 - n. medir los niveles de proteína quimioatrayente de monocitos en la orina del sujeto;
 - o. medir los niveles de factor de crecimiento del tejido conectivo en la orina del sujeto;
 - p. medir fragmentos de colágeno IV en la orina del sujeto;
 - q. medir fragmentos de colágeno III en la orina del sujeto; y/o
 - r. medir los niveles de proteína de podocitos en la orina del sujeto, en donde la proteína de podocitos se selecciona de nefrina y podocina.
7. El oligonucleótido modificado para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la administración mejora uno o más marcadores de la función renal en el sujeto, seleccionados entre:

- 5 a. nitrógeno ureico en sangre reducido en el sujeto;
b. creatinina reducida en la sangre del sujeto;
c. aclaramiento de creatinina mejorado en el sujeto;
d. proteinuria reducida en el sujeto;
e. relación reducida de albúmina: creatinina en el sujeto;
f. tasa de filtración glomerular mejorada en el sujeto;
g. cistatina C reducida en la sangre del sujeto;
h. reducida proteína de traza β en la sangre del sujeto;
10 i. reducción de 2-microglobulina en la sangre de un sujeto;
j. proteína N-acetil- β -D-glucosaminidasa reducida en la orina del sujeto;
k. proteína lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos reducida en la orina del sujeto;
l. proteína renal reducida de la molécula 1 de daño renal en la orina del sujeto;
m. proteína interleucina-18 reducida en la orina del sujeto;
15 n. niveles reducidos de proteína quimioatrayente de monocitos en la orina del sujeto;
o. niveles reducidos de factor de crecimiento del tejido conectivo en la orina del sujeto;
p. fragmentos reducidos de colágeno IV en la orina del sujeto;
q. fragmentos reducidos de colágeno III en la orina del sujeto; y/o
r. niveles reducidos de proteína de podocitos en la orina del sujeto, en donde la proteína de podocitos se
20 selecciona de nefrina y podocina.
8. El oligonucleótido modificado para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 4, 6 o 7, en donde la proteinuria es albuminuria, por ejemplo, albuminuria normal alta, microalbuminuria o macroalbuminuria.
- 25 9. El oligonucleótido modificado para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el Síndrome de Alport es la forma ligada al X del Síndrome de Alport o la forma autosómica del Síndrome de Alport.
10. El oligonucleótido modificado de la reivindicación 9, en el que:
- 30 (i) el sujeto es masculino y el síndrome de Alport es la forma ligada al X del síndrome de Alport;
(ii) el sujeto es hombre y el síndrome de Alport es la forma autosómica del síndrome de Alport;
(iii) el sujeto es femenino y el síndrome de Alport es la forma ligada al X del síndrome de Alport; o
(iv) el sujeto es mujer y el síndrome de Alport es la forma autosómica del síndrome de Alport.
- 35 11. El oligonucleótido modificado de la reivindicación 10 (ii) o la reivindicación 10 (iv), en donde el sujeto tiene:
- (a) una mutación en el gen que codifica la cadena alfa 3 del colágeno tipo IV; o
(b) una mutación en el gen que codifica la cadena alfa 4 del colágeno tipo IV.
- 40 12. El oligonucleótido modificado de la reivindicación 9, en donde el Síndrome de Alport es la forma autosómica recesiva del síndrome de Alport.
13. El oligonucleótido modificado de la reivindicación 9, en donde el síndrome de Alport es la forma autosómica dominante del síndrome de Alport.
- 45 14. El oligonucleótido modificado para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende administrar al menos una terapia adicional seleccionada de un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina II opcionalmente seleccionado de captopril, enalapril, lisinopril, benazepril, quinapril, fosinopril y ramipril, un bloqueador de receptor de angiotensina II seleccionado opcionalmente de candesartán, irbesartán, olmesartán, losartán, valsartán, telmisartán y eprosartán, un agente antihipertensivo, un análogo de vitamina D, un aglutinante de fosfato oral, diálisis y trasplante de riñón.
- 50 15. El oligonucleótido modificado para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, 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 miR-21 como definido en SEQ ID NO: 1.
- 55 16. El oligonucleótido modificado para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el oligonucleótido modificado consta de 15 a 25 nucleósidos unidos, por ejemplo en donde el oligonucleótido modificado consiste en 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleósidos unidos.
- 60 17. El oligonucleótido modificado para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el oligonucleótido modificado comprende al menos un nucleósido modificado, opcionalmente seleccionado de un nucleósido S-cEt, un nucleósido de 2'-O-metoxietilo y un nucleósido de LNA.
- 65 18. El oligonucleótido modificado para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el oligonucleótido modificado comprende al menos un enlace internucleosídico modificado, o en donde cada enlace

internucleósido del oligonucleótido modificado es un enlace internucleosídico modificado; opcionalmente en donde el enlace internucleosídico modificado es un enlace internucleósido fosforotioato.

19. Un oligonucleótido modificado de la estructura 5'-AECsATCsAGTCsTGAUsAAGCsTAE-3', donde nucleósidos no seguidos por un subíndice son β -D-desoxirribonucleósidos; los nucleósidos seguidos de un subíndice "E" son nucleósidos 2'-MOE; los nucleósidos seguidos de un subíndice "S" son nucleósidos S-cEt, y cada enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico de fosforotioato, para usar en un método de tratamiento del Síndrome de Alport.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

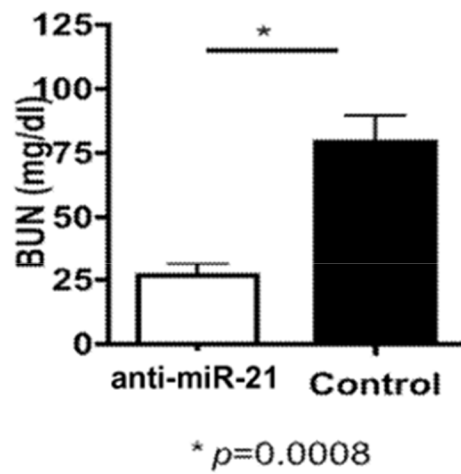
55

60

65

Figura 1.

A.



B.

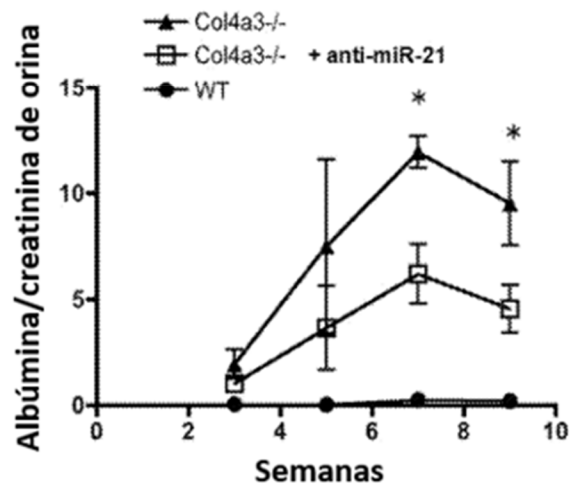


Figura 2.

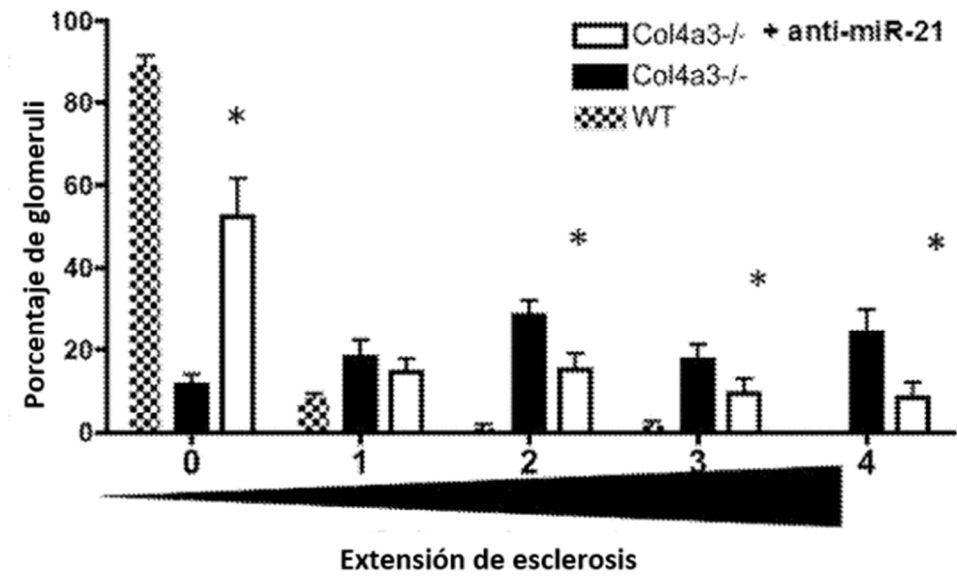
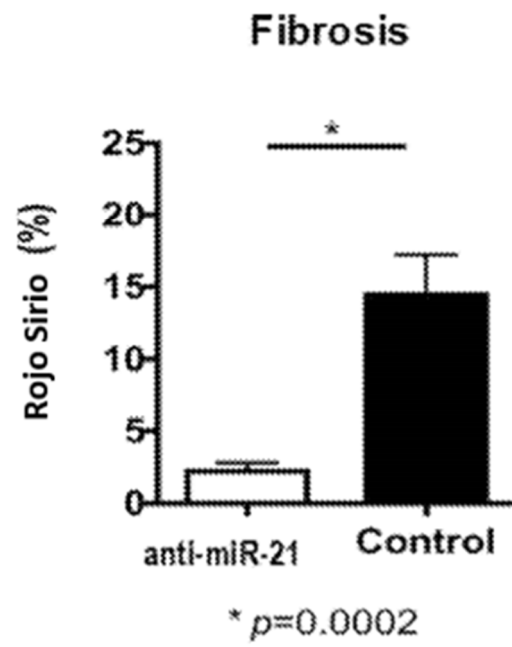


Figura 3.

A.



B.

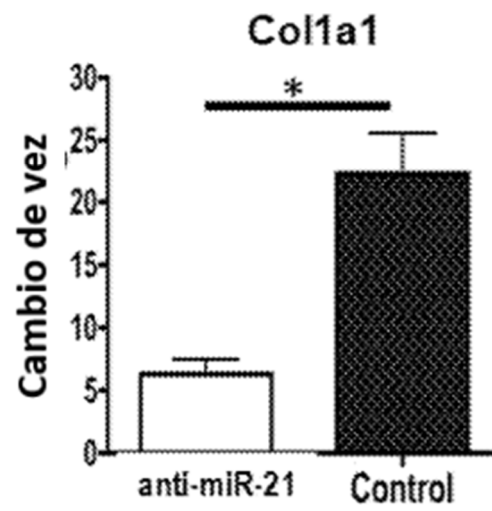
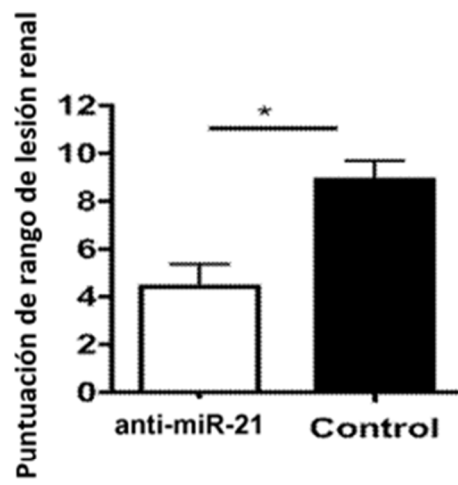
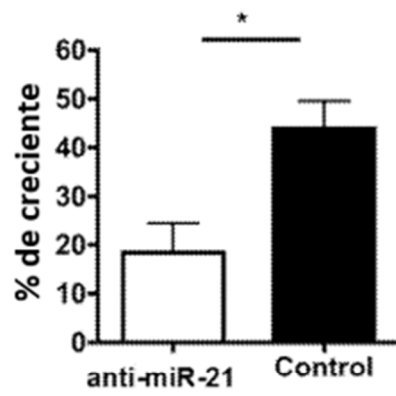


Figura 4.

A.



B.



C.

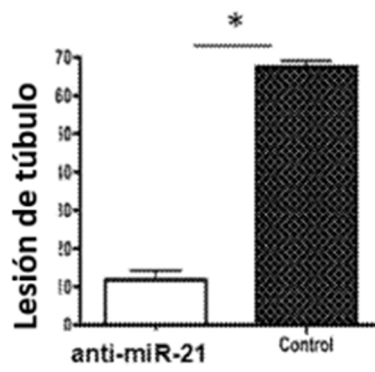
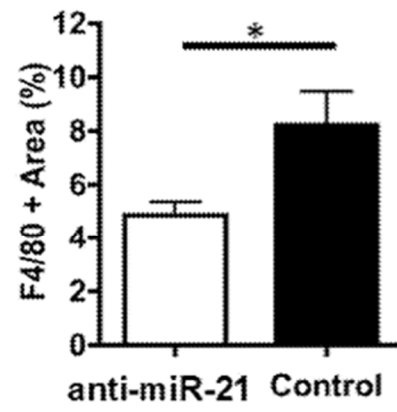


Figura 5.

A.



B.

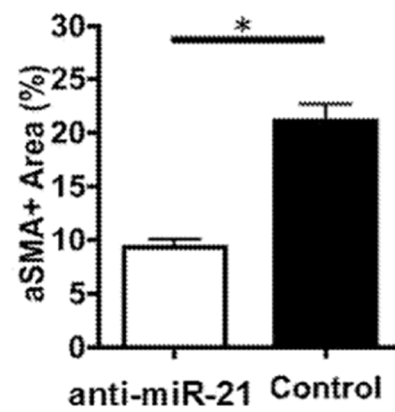


Figura 6.

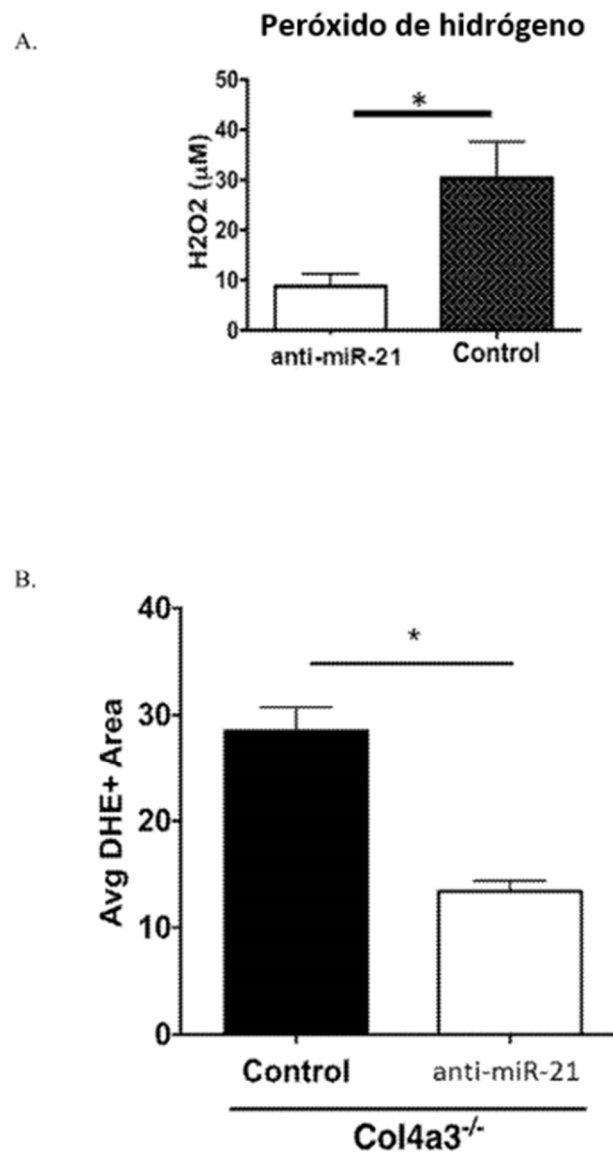


Figura 7.

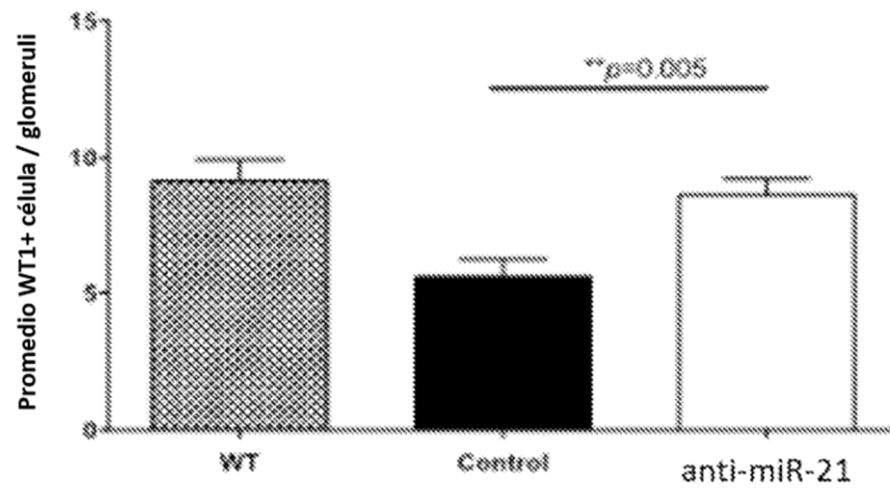
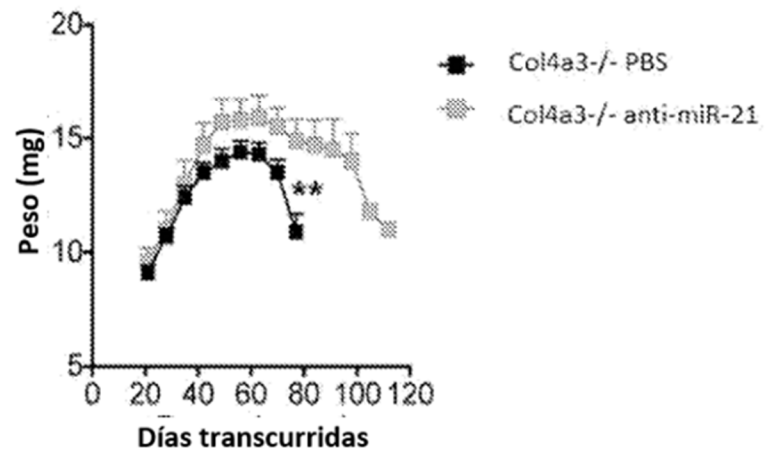


Figura 8.

A.



B.

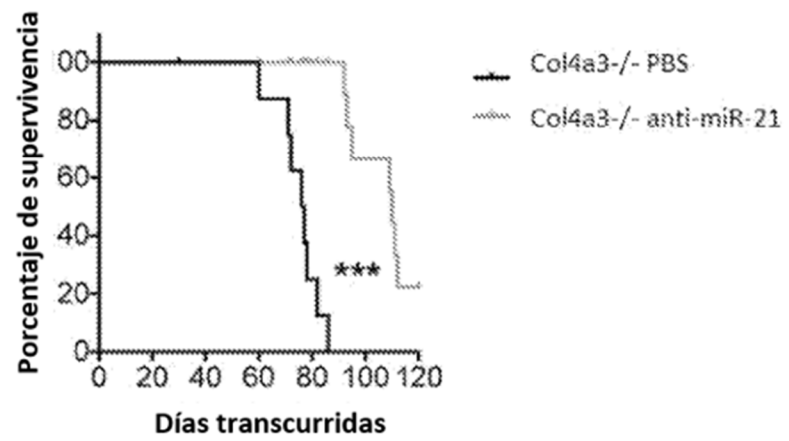
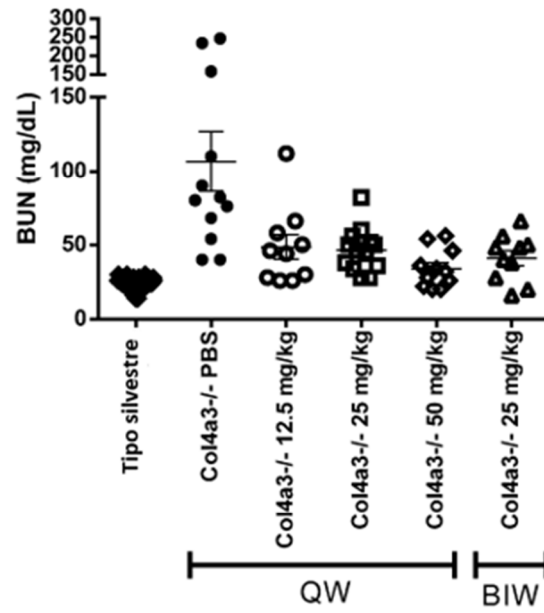


Figura 9.

A.



B.

