

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 960 488**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2013** **E 19188663 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2023** **EP 3620522**

54 Título: **Métodos de tratamiento del 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:
05.03.2024

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:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 960 488 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 del síndrome de Alport

5 Campo de la invención

Se proporciona aquí un oligonucleótido modificado para uso en un método para el tratamiento del síndrome de Alport.

Descripción de la técnica relacionada

10 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.

15 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*.

30 Damien Noone et al. (Pediatric Nephrology, vol. 28, no.7, 2012) se refieren a tratamientos potenciales de la progresión de la enfermedad del síndrome de Alport. Zhong et al. (Journal of the American Society of Nephrology, vol. 22, no. 9, 2011) se refieren al establecimiento de la relación entre miR-21 y la fibrosis renal, y demuestran que miR-21 estaba aumentado en las células epiteliales tubulares (TEC) en respuesta al TGF-β1 y los riñones fibróticos.

35 Sumario de la invención

La presente invención proporciona un oligonucleótido modificado para uso en un método para tratar el síndrome de Alport, que comprende administrar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene síndrome de Alport el oligonucleótido modificado, en el que el oligonucleótido modificado tiene la estructura 5'-AECsATCsAGTCsTGAUsAAGCsTA_E-3', (SEQ ID NO: 5), en la que los nucleósidos no seguidos de 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 del oligonucleótido modificado es un enlace internucleosídico de fosforotioato; en el que la administración comprende administrar una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido modificado en una dosis de 110 mg.

45 En ciertas realizaciones, al sujeto se le ha diagnosticado 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.

50 En cualquiera de las realizaciones proporcionadas aquí, la administración del 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 del sujeto.

En cualquiera de las realizaciones proporcionadas aquí, la administración del oligonucleótido modificado complementario a miR-21, a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene el síndrome de Alport, puede reducir la hematuria; retrasar la aparición de hematuria; reducir la proteinuria; retrasar la aparición de proteinuria; reducir la fibrosis renal; ralentizar la progresión adicional de la fibrosis; y/o detener la progresión adicional de la fibrosis.

60 En cualquiera de las realizaciones proporcionadas aquí, el sujeto puede tener una mutación seleccionada de una mutación en el gen que codifica la cadena alfa 3 de colágeno de tipo IV, una mutación en el gen que codifica la cadena alfa 4 de colágeno de tipo IV, o una mutación en el gen que codifica la cadena alfa 5 de colágeno de tipo IV. En ciertas realizaciones, el sujeto es un hombre. En ciertas realizaciones, el sujeto es una mujer. 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.

5 Cualquiera de las realizaciones proporcionadas aquí puede comprender la medida 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; medir la relación albúmina:creatinina en el sujeto; y/o medir la tasa de filtración glomerular en el sujeto.

10 Cualquiera de las realizaciones proporcionadas aquí 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; medir 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 conjuntivo (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 el que la proteína de podocitos se selecciona de nefrina y podocina. Cualquiera de las realizaciones proporcionadas aquí puede comprender medir la proteína cistatina C en 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.

20 Cualquiera de las realizaciones proporcionadas aquí puede mejorar uno o más marcadores de la función renal en el sujeto, seleccionados de nitrógeno ureico 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 las realizaciones proporcionadas aquí puede mejorar uno o más marcadores de la función renal en el sujeto, seleccionados de NAG reducida en la orina del sujeto; NGAL reducida en la orina del sujeto; KIM-1 reducida en la orina del sujeto; IL-18 reducida en la orina del sujeto; MCP1 reducida en la orina del sujeto; CTGF reducido en la orina del sujeto; fragmentos de colágeno IV reducidos en la orina del sujeto; fragmentos de colágeno III reducidos en la orina del sujeto; y niveles reducidos de proteína de podocitos en la orina del sujeto, en los que la proteína de podocitos se selecciona de nefrina y podocina. Cualquiera de los métodos proporcionados aquí pueden mejorar uno o más marcadores de la función renal, seleccionados de proteína cistatina C reducida en la sangre de un sujeto, proteína traza β -(BTP) reducida en la sangre de un sujeto, y 2-microglobulina (B2M) reducida en la sangre de un sujeto.

35 En cualquiera de las realizaciones proporcionadas aquí, la proteinuria es albuminuria. La albuminuria puede ser albuminuria normal alta, microalbuminuria, o macroalbuminuria.

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.

40 Cualquiera de las realizaciones proporcionadas aquí puede comprender la administración de al menos una terapia adicional seleccionada a partir de un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina II (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 ACE se selecciona de cilazapril, perindopril, y trandolapril.

50 En ciertas realizaciones, un inhibidor de la ACE se administra a una dosis que oscila de 0,5 a 1 mg/m²/día, de 1 a 6 mg/m²/día, de 1 a 2 mg/m²/día, de 2 a 4 mg/m²/día, o de 4 a 8 mg/m²/día.

En ciertas realizaciones, un ARB se administra a una dosis que oscila de 6,25 a 150 mg/m²/día. En cualquiera de estas realizaciones, un ARB se administra 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.

55 En ciertas realizaciones, la al menos una terapia adicional 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 oscila de 10 a 35 mg diarios. En ciertas realizaciones, la espironolactona se administra a una dosis de 25 mg diarios.

60 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Anti-miR-21 mejora la función renal de ratones *Col4a3*^{-/-}. Nitrógeno ureico en sangre (BUN) a las 9 semanas (A), y relación de albúmina/creatinina en orina en las semanas 3, 5, 7 y 9 (B). * indica significancia estadística.

65

Figura 2. Anti-miR-21 previene la glomeruloesclerosis en ratones *Col4a3*^{-/-}. La glomeruloesclerosis se evaluó usando puntuaciones de esclerosis semicuantitativas 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 transcritos de *Col1a1* normalizada a GAPDH (n = 6). * indica significancia 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 medialunas glomerulares (n = 5). (C) Cuantificación de la lesión del túbulo (n = 5). * indica significancia 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 significancia 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 de PBS (n = 8; * indica significancia estadística); (B) Cuantificación de DES en tejido renal de ratones *Col4a3*^{-/-} tratados con anti-miR-21 o control de PBS, y en ratones de tipo salvaje (n = 3 por grupo; * indica significancia 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 anti-miR-21 o control de 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 anti-miR-21 o control de PBS (p <0,01); (B) Esperanza de vida de ratones *Col4a3*^{-/-} tratados con anti-miR-21 o control de PBS (p <0,001).

Figura 9. Anti-miR-21 mejora la función renal y aumenta la esperanza de vida 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) Esperanza de vida 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

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados 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 descritos aquí son los bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. En el caso de que haya una pluralidad de definiciones para los términos aquí, 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, y la 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.

Debe entenderse que la terminología usada aquí es con el fin de describir solamente realizaciones particulares, y no pretende ser limitativa. Debe notarse que, como se usa en la memoria descriptiva 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

"Síndrome de Alport" significa una forma hereditaria de la enfermedad renal en la que se produce un nivel anormal de membrana glomerular basal (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.

"Hematuria" significa la presencia de glóbulos rojos en la orina.

- 5 "Albuminuria" significa la presencia de exceso de albúmina en la orina, e incluye sin limitación, albuminuria normal, albuminuria normal alta, 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.
- 10 "Albuminuria normal alta" 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.
- 15 "Microalbuminuria" significa albuminuria elevada 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.
- 20 "Macroalbuminuria" significa albuminuria elevada 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.
- 25 "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.
- 30 "Tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) o "tasa de filtración glomerular (TFG)" significa una medida de lo bien que los riñones están filtrando creatinina, y se usa como una estimación de cuánta sangre pasa a través de los glomérulos por minuto. Resultados normales pueden oscilar de 90-120 ml/min/1,73 m². Los niveles por debajo de 60 ml/min/1,73 m² durante 3 o más meses pueden ser un indicador de enfermedad renal crónica. Los niveles por debajo de 15 ml/min/1,73 m² pueden ser un indicador de insuficiencia renal.
- 35 "Proteinuria" significa la presencia de un exceso de proteínas séricas en la orina. La 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 relación de creatinina de \square 0,20 mg/mg. Las proteínas séricas elevadas en asociación con proteinuria incluyen, sin limitación, la albúmina.
- 40 "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 ureico por 100 ml (7-21 mg/dl) de sangre. La medida 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.
- 45 "Enfermedad renal en etapa terminal (ESRD)" significa el fallo completo o casi completo de la función renal.
- 50 "Función renal deteriorada" significa función renal reducida, con respecto a la función renal normal.
- 55 "Fibrosis" significa la formación o el desarrollo de un exceso de tejido conjuntivo 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 conjuntivo 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.
- 60 "Ralentiza la progresión adicional" significa reducir la velocidad a la que una afección médica se mueve hacia un estado avanzado.
- 65 "Detiene la progresión adicional" significa detener la progresión de una afección médica a un estado avanzado.
- "Tiempo de retraso para la diálisis" significa mantener suficiente función renal de manera que se retrase la necesidad de tratamiento de diálisis.
- "Tiempo de retraso para el trasplante renal" significa mantener suficiente función renal de manera que se retrase la necesidad de un trasplante renal.
- "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.
- "Anti-miR" significa un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleobases complementaria a un microARN. En ciertas realizaciones, un anti-miR es un oligonucleótido modificado.

- 5 "Anti-miR-X" en el que "miR-X" designa un microARN particular, significa un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleobases 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.
- 10 "miR-21" significa el miARN maduro que tiene la secuencia de nucleobases UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA (SEQ ID NO: 1).
- "Secuencia de tallo-bucle de miR-21" significa la secuencia de tallo-bucle que tiene la secuencia de nucleobases UGUCGGGUAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUGAAUCUCAUGGCAACACCAGUCGAU GGGCUGUCUGACA (SEQ ID NO: 2).
- 15 "Ácido nucleico diana" se refiere a un ácido nucleico para el que se diseña un compuesto oligomérico para que se hibride.
- "Direccionamiento" significa el proceso de diseño y selección de secuencia de nucleobases que se hibridará a un ácido nucleico diana.
- 20 "Dirigido contra" significa que tiene una secuencia de nucleobases que permitirá la hibridación a un ácido nucleico diana.
- 25 "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.
- 30 "Expresión" significa cualesquiera funciones y etapas por las cuales la información codificada de un gen se convierte en estructuras presentes y que operan en una célula.
- "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 nucleobases.
- 35 "Nucleobases contiguas" significa nucleobases inmediatamente adyacentes la una a la otra en un ácido nucleico.
- "Complementariedad de nucleobases" significa la capacidad de dos nucleobases para emparejarse de manera no covalente a través de enlaces de hidrógeno.
- 40 "Complementario" significa que un ácido nucleico es capaz de hibridarse con otro ácido nucleico u oligonucleótido. En ciertas realizaciones, complementario se refiere a un oligonucleótido capaz de hibridarse con un ácido nucleico diana.
- 45 "Totalmente complementario" significa que cada nucleobase de un oligonucleótido es capaz de emparejarse 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 realizaciones, un oligonucleótido en el que cada nucleobase tiene complementariedad con una nucleobase dentro de una región de una secuencia de tallo-bucle del microARN es completamente complementario a la secuencia de tallo-bucle del microARN.
- 50 "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 entre el número total de nucleobases en el oligonucleótido.
- 55 "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 entre 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.
- 60 "Hibridar" significa el apareamiento de ácidos nucleicos complementarios que se produce a través de la complementariedad de nucleobases.
- 65 "Error de emparejamiento" significa que una nucleobase de un primer ácido nucleico no es capaz de emparejarse según Watson-Crick con una nucleobase en la posición correspondiente de un segundo ácido nucleico.

"Idéntico", en el contexto de secuencias de nucleobases, significa que tiene la misma secuencia de nucleobases, independiente de las modificaciones de azúcar, de enlace, y/o de nucleobases, e independiente del estado de metilo de cualesquiera pirimidinas presentes.

5 "MicroARN" significa un ARN no codificante endógeno de 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://microma.sanger.ac.uk/>). En ciertas realizaciones, el microARN se abrevia como "microARN" o "miR".

10 "Pre-microARN" o "pre-miR" significa un ARN no codificante que tiene una estructura de horquilla, que es el producto de la escisión de un pri-MIR por la ribonucleasa específica de ARN de doble hebra conocida como Drosha.

"Secuencia de tallo-bucle" significa un ARN que tiene una estructura de horquilla y que contiene una secuencia de microARN maduro. Las secuencias pre-microRNA y las secuencias de tallo-bucle pueden superponerse. Se encuentran ejemplos de secuencias de tallo-bucle en la base de datos de microARN conocida como miRBase (<http://microma.sanger.ac.uk/>).

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

20 "Precursor de microARN" significa un transcrito 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.

25 "Transcripción regulada por microARN" significa una transcripción que está regulada por un microARN.

"Secuencia de semilla" significa una secuencia de nucleobases que comprende de 6 a 8 nucleobases contiguas de nucleobases 1 a 9 del extremo 5' de una secuencia de microARN maduro.

30 "Secuencia de coincidencia de semilla" significa una secuencia de nucleobases que es complementaria a una secuencia de semilla, y tiene la misma longitud que la secuencia de semilla.

35 "Compuesto oligomérico" se refiere a un compuesto que comprende una pluralidad de subunidades monoméricas enlazadas. Los compuestos oligoméricos incluyen oligonucleótidos.

"Oligonucleótido" se refiere a un compuesto que comprende una pluralidad de nucleósidos enlazados, cada uno de los cuales puede estar modificado o no modificado, independientes uno del otro.

40 "Enlace internucleosídico de origen natural" significa un enlace de fosfodiéster 3' a 5' entre nucleósidos.

"Azúcar natural" significa un azúcar que se encuentra en el ADN (2'-H) o ARN (2'-OH).

45 "Enlace internucleosídico" significa un enlace covalente entre nucleósidos adyacentes.

"Nucleósidos unidos" significa nucleósidos unidos por un enlace covalente.

"Nucleobase" significa un resto heterocíclico capaz de emparejarse de forma no covalente con otra nucleobase.

50 "Nucleósido" significa una nucleobase ligada a un resto de azúcar.

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

55 "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.

60 "Oligonucleótido modificado" significa un oligonucleótido que tiene una o más modificaciones con respecto a un enlace terminal, de azúcar, de nucleobase y/o internucleosídico natural. Un oligonucleótido modificado puede comprender nucleósidos no modificados.

65 "Oligonucleótido modificado monocatenario" quiere decir un oligonucleótido modificado que no se hibrida con una cadena complementaria.

- 5 "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.
- "Enlace internucleosídico modificado" significa cualquier cambio de un enlace internucleosídico natural.
- 10 "Enlace internucleosídico de fosforotioato" significa un enlace entre nucleósidos en el que uno de los átomos que no forman puentes es un átomo de azufre.
- "Resto de azúcar modificado" significa la sustitución y/o cualquier cambio de un azúcar natural.
- 15 "Nucleobase no modificada" significa las bases heterocíclicas de origen natural de ARN o ADN: las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) (incluyendo 5-metilcitosina), y uracilo (U).
- "5-metilcitosina" significa una citosina que comprende un grupo metilo unido a la posición 5.
- 20 "Citosina no metilada" significa una citosina que no tiene un grupo metilo unido a la posición 5.
- "Nucleobase modificada" significa cualquier nucleobase que no es una nucleobase no modificada.
- "Resto de azúcar" significa un furanosilo de origen natural o un resto de azúcar modificado.
- 25 "Resto de azúcar modificado" significa un resto de azúcar sustituido o un sustituto de azúcar.
- "2'-O-metil azúcar" o "2-OMe azúcar" significa un azúcar que tiene una modificación de O-metilo en la posición 2'.
- 30 "2'-O-metoxietil azúcar" o "2'-MOE azúcar" significa un azúcar que tiene una modificación de O-metoxietilo en la posición 2'.
- "2'-fluoro" o "2'-F" significa un azúcar que tiene una modificación de fluoro en la posición 2'.
- 35 "Resto de azúcar bicíclico" se entiende un resto de azúcar modificado que comprende un anillo de 4 a 7 miembros (incluyendo, pero no limitado a, 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 limitativos incluyen LNA, ENA, cEt, S-cEt, y R-cEt.
- 40 "Resto de azúcar de ácido nucleico bloqueado (LNA)" significa un resto de azúcar sustituido que comprende un puente (CH₂)₂-O entre los átomos 4' y 2' del anillo de furanosa.
- 45 "Resto de azúcar ENA" significa un resto de azúcar sustituido que comprende un puente (CH₂)₂-O entre los átomos 4' y 2' del anillo de furanosa.
- "Resto de azúcar de etilo restringido (cET)" significa un resto de azúcar sustituido que comprende un puente CH(CH₃)-O entre los átomos 4' y 2' del anillo de furanosa. En ciertas realizaciones, el puente CH(CH₃)-O está restringido en la orientación S. En ciertas realizaciones, el (CH₂)₂-O está restringido en la orientación R.
- 50 "Resto de azúcar S-cET" significa un resto de azúcar sustituido que comprende un puente CH(CH₃)-O restringido en la orientación S entre la posición de átomos 4' y 2' del anillo de furanosa.
- 55 "Resto de azúcar R-cET" significa un resto de azúcar sustituido que comprende un puente CH(CH₃)-O restringido en la orientación R entre la posición de átomos 4' y 2' del anillo de furanosa.
- "2'-O-metil nucleósido" significa un nucleósido modificado en 2' que tiene una modificación de 2'-O-metil azúcar.
- 60 "2'-O-metoxietil nucleósido" significa un nucleósido modificado en 2' que tiene una modificación de 2'-O-metoxietil azúcar. Un 2'-O-metoxietil nucleósido puede comprender una nucleobase modificada o no modificada.
- "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.
- 65 "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.

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

5 "Nucleósido S-cEt" significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar S-cEt.

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

"□-D-desoxirribonucleósido" significa un nucleósido de ADN de origen natural.

10 "□-D-ribonucleósido" significa un nucleósido de ARN de origen natural.

"LNA nucleósido" significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar de LNA.

15 "ENA nucleósido" significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar ENA.

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

"Sujeto que lo necesita" significa un sujeto que se identifica como en la necesidad de una terapia o tratamiento.

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

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

25 "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.

30 "Administración subcutánea" se refiere a la administración justo debajo de la piel.

"Administración intravenosa" significa administración en una vena.

35 "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 concomitante 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 sólo necesitan superponerse por un período de tiempo y no necesitan ser coextensivos.

40 "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.

45 "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.

"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.

50 "Mejorar" significa disminuir la gravedad de al menos un indicador de una afección o enfermedad. En ciertas realizaciones, la mejora incluye un retraso o ralentización 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 técnica.

55 "En riesgo de desarrollar" significa el estado en el que 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 que la requerida para que se le diagnostique la afección o enfermedad.

60 "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.

65

"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.

"Agente terapéutico" significa un agente farmacéutico usado para la cura, mejora o prevención de una enfermedad.

"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, comprimidos, o inyecciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, cuando 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.

"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.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente farmacéutico que proporciona un beneficio terapéutico a un animal.

"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 disolución acuosa estéril.

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

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

"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 ureico en sangre, una reducción en proteinuria, una reducción en albuminuria, etc.

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

"Efecto secundario" significa una respuesta fisiológica atribuible a un tratamiento distinta 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.

"Cumplimiento del sujeto" significa la adhesión a un tratamiento recomendado o prescrito por un sujeto.

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

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

El término "sangre", como se usa aquí, abarca sangre entera y fracciones de sangre, tales como suero y plasma.

Descripción general

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.

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 contra 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 aquí además que anti-miR-21 mejora la supervivencia en un modelo experimental de síndrome de Alport. Como tal, estos oligonucleótidos modificados dirigidos contra miR-21 son útiles para el tratamiento del síndrome de Alport.

5 *Ciertos usos de la invención*

Como se señaló anteriormente, la presente invención proporciona un oligonucleótido modificado para uso en un método para tratar el síndrome de Alport, que comprende administrar el oligonucleótido modificado a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene síndrome de Alport, en el que el oligonucleótido modificado tiene la estructura 5'-AECsATCsAGTCsTGAUsAAGCsTA-E-3', (SEQ ID NO: 5), en la que los nucleósidos no seguidos de 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 del oligonucleótido modificado es un enlace internucleosídico de fosforotioato; en el que la administración comprende administrar una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido modificado en una dosis de 110 mg.

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, sin limitación, los antecedentes familiares del sujeto, características clínicas (que incluyen, sin limitación, proteinuria, albuminuria, hematuria, GFR alterada, 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 alfa-5 de colágeno 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*.

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.

En ciertas realizaciones, la administración del 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.

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 comienzo de la hematuria. En ciertas realizaciones, la administración reduce la proteinuria. En ciertas realizaciones, la administración retrasa el comienzo de la proteinuria.

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

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.

En cualquiera de las realizaciones proporcionadas aquí, un sujeto puede someterse a ciertas pruebas para evaluar la función renal. Dichas pruebas incluyen, sin limitación, la medida 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; medir la relación albúmina:creatinina en el sujeto; medir la tasa de filtración glomerular en el sujeto; y medir el gasto urinario en el sujeto.

En cualquiera de las realizaciones proporcionadas aquí, las proteínas presentes en la orina o la sangre pueden usarse para evaluar la función renal. Dichas pruebas de la función renal incluyen, pero no se limitan a, medir la proteína N-acetil-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 conjuntivo (CTGF) en la orina del sujeto; medir los niveles de proteína quimioatrayente 1 de monocitos (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 C en la sangre de un sujeto; medir la proteína de traza α_2 -(BTP) en la sangre de un sujeto; y medir 2-microglobulina (B2M) en la sangre de un sujeto. En cualquiera de las realizaciones proporcionadas aquí, los marcadores de la lesión de 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) usando kits comercialmente disponibles.

En cualquiera de las realizaciones proporcionadas aquí, la administración del oligonucleótido modificado dirigido contra 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

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, el oligonucleótido modificado es para uso en un método 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 el oligonucleótido modificado.

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

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.

En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos incluyen inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II (ACE). En ciertas realizaciones, un inhibidor de la ACE es captopril, enalapril, lisinopril, benazepril, quinapril, fosinopril, o ramipril.

En ciertas realizaciones, un agente farmacéutico es un agente antihipertensivo. Los agentes antihipertensivos se usan para controlar la tensión arterial del sujeto.

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

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

En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos incluyen agentes inmunosupresores. En ciertas realizaciones, un agente inmunosupresor es un corticosteroide, ciclofosfamida, o micofenolato mofetilo.

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

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.

En ciertas realizaciones, una terapia adicional es la diálisis. En ciertas realizaciones, una terapia adicional es trasplante renal.

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 fármaco antiinflamatorio no esteroideo. En ciertas realizaciones, un agente antiinflamatorio no esteroideo es ibuprofeno, un inhibidor de COX-1, o un inhibidor de COX-2.

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

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.

Ciertas secuencias de nucleobases de microARN

El oligonucleótido modificado para uso de la invención tiene una secuencia de nucleobases que es complementaria a miR-21 (SEQ ID NO: 1).

- 5 Al estar la secuencia de miR-21 contenida dentro de la secuencia del precursor 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.

Ciertos oligonucleótidos modificados

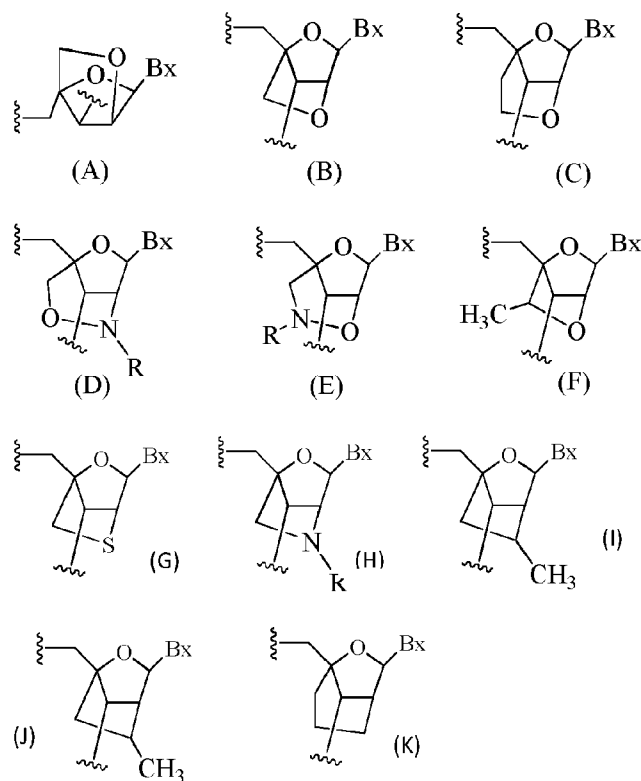
- 10 El oligonucleótido modificado para uso de la invención tiene la estructura 5'-A_EC_SATC_SAGTC_STGAU_SAAGC_STA_E-3' (SEQ ID NO: 3), en la que los nucleósidos no seguidos de un subíndice indican □-D-desoxirribonucleósidos; los nucleósidos seguidos de un subíndice "E" indican nucleósidos 2'-MOE; los nucleósidos seguidos de un subíndice "S" indican nucleósidos S-cEt; y cada enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico de fosforotioato.
- 15 En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado para uso de la invención comprende una o más 5-metilcitosinas. En ciertas realizaciones, cada citosina de un oligonucleótido modificado comprende una 5-metilcitosina.

Ciertas modificaciones

- 20 Un oligonucleótido puede comprender una o más modificaciones a una nucleobase, azúcar y/o enlace internucleosídico, y como tal es un oligonucleótido modificado. Una nucleobase, un azúcar y/o un enlace internucleosídico modificados pueden seleccionarse sobre una forma no modificada debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad mejorada por otros oligonucleótidos u dianas de ácido nucleico, y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas. El oligonucleótido para uso, como se cita en las reivindicaciones, es un oligonucleótido modificado.
- 25

Los nucleósidos que comprenden tales restos de azúcares bicíclicos se denominan nucleósidos bicíclicos o BNAs. Los nucleósidos bicíclicos incluyen, pero no se limitan a, (A) α-L-Metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA; (B) □-D-Metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA; (C) Etilenoxi (4'-(CH₂)₂-O-2') BNA; (D) Aminooxi (4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA; (E) Oxiamino (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA; (F) Metil(metilenoxi) (4'-CH(CH₃)-O-2') BNA (también denominado etilo constreñido o cEt); (G) metilen-tio (4'-CH₂-S-2') BNA; (H) metilen-amino (4'-CH₂-N(R)-2') BNA; (I) metil (4'-CH₂-CH(CH₃)-2') BNA carbocíclico; (J) c-MOE (4'-CH₂-OMe-2') BNA, y (K) propilen (4'-(CH₂)₃-2') BNA carbocíclico, como se representa a continuación.

30



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

- 45 Un nucleósido modificado en 2' comprende un grupo sustituyente en 2' seleccionado de F, OCF₃, O-CH₃, OCH₂CH₂OCH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(CH₃)₂, -O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂, y O-CH₂-C(=O)-N(H)CH₃.

Cada enlace internucleosídico del oligonucleótido modificado es un enlace internucleósido de fosforotioato.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado para uso 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-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. En ciertas realizaciones, una nucleobase modificada se selecciona de pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas, y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2 aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina.

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.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado para uso 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 hidratos de carbono, fosfolípidos, biotina, fenazina, ácido fólico, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas, y colorantes. En ciertas realizaciones, el resto de hidrato de carbono es N-acetil-D-galactosamina (GalNac). En ciertas realizaciones, un grupo conjugado se une directamente al oligonucleótido. En ciertas realizaciones, un grupo conjugado está unido al 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), 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), ácido 6-aminohexanoico (AHEX o AHA), alquilo de C1-C10 sustituido, alqueno de C2-C10 sustituido o no sustituido, y alquino de C2-C10 sustituido o no sustituido. En ciertas de tales realizaciones, un grupo sustituyente se selecciona de hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenilo, nitro, tiol, tioalcoxi, halógeno, alquilo, arilo, alqueno y alquino.

En ciertas de tales realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado que tiene uno o más grupos estabilizadores que están unidos a uno o ambos extremos del oligonucleótido modificado para mejorar propiedades tales como, por ejemplo, la estabilidad de la nucleasa. Se incluyen en los grupos estabilizadores las estructuras de caperuza. 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 caperuza puede estar presente en el extremo 5' (caperuza de 5'), o en el extremo 3' (caperuza de 3'), o puede estar presente en ambos extremos. Las estructuras de caperuza incluyen, por ejemplo, las caperuzas desoxi abasicas invertidas.

Ciertas composiciones farmacéuticas

Se proporcionan aquí composiciones farmacéuticas que comprenden el oligonucleótido modificado para uso como se describe aquí, para uso en un método para tratar el síndrome de Alport, que comprende administrar a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene síndrome de Alport la composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido modificado.

Vías de administración adecuadas incluyen, pero no se limitan a, oral, rectal, transmucosa, intestinal, entérica, tópica, supositorio, por inhalación, intratecal, intracardiaca, intraventricular, intraperitoneal, intranasal, intraocular, intratumoral, y parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intramedular, y subcutánea). 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).

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica se administra en forma de una unidad de dosificación (por ejemplo, comprimido, cápsula, bolo, etc.). En ciertas realizaciones, tal composición farmacéutica comprende el oligonucleótido modificado a una dosis de 110 mg.

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 disolución salina estéril para inyección. El producto reconstituido se administra como una inyección subcutánea o como una infusión intravenosa después de la dilución en disolución salina. El fármaco liofilizado consiste en el oligonucleótido modificado que se ha preparado en agua para inyección, o en disolución salina para inyección, ajustado a pH 7,0-9,0 con ácido o base durante la preparación, y después liofilizado. El fármaco liofilizado puede envasarse en un vial de vidrio transparente tipo I de 2 ml (tratado con sulfato de amonio), se puede tapar con un cierre de goma de bromobutilo, y se puede sellar con un sello de aluminio FLIP-OFF®.

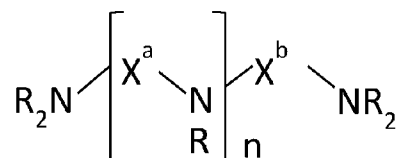
En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden contener adicionalmente otros componentes adjuntos que se encuentran convencionalmente en composiciones farmacéuticas, a sus niveles de uso establecidos en la técnica. Así, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente 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, tales como colorantes, aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, espesantes y estabilizantes. Sin embargo, tales materiales, cuando se añaden, 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, amortiguadores, colorantes, saborizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no lo hacen interactuar de manera nociva con los oligonucleótidos de la formulación.

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, un resto lipídico se selecciona para aumentar la distribución de un agente farmacéutico a una célula o tejido particular. En ciertas realizaciones, un resto lipídico se selecciona para aumentar la distribución de un agente farmacéutico al tejido graso. En ciertas realizaciones, un resto lipídico se selecciona para aumentar la distribución de un agente farmacéutico al tejido muscular.

En ciertas realizaciones, se usa INTRALIPID para preparar una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido. Intralipid 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 añadido hidróxido de sodio para ajustar el pH de modo que el intervalo de pH del producto final sea 6 a 8,9.

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada aquí 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 la que cada X^a y X^b , para cada aparición, es independientemente alquileo de C1-6; n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; cada R es independientemente H, en la que al menos n + 2 de los restos R en al menos alrededor de 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).

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas aquí comprenden uno o más oligonucleótidos modificados para uso y uno o más excipientes. En ciertas de tales realizaciones, los excipientes se seleccionan de agua, disoluciones salinas, alcohol, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilasa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona.

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada aquí se prepara usando técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, procedimientos de mezclamiento, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsionamiento, encapsulación, atrapamiento, o formación de comprimidos.

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

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

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada aquí 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.

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada aquí comprende un sistema de administración. Los ejemplos de sistemas de administración incluyen, pero no se limitan a, 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.

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada aquí comprende una o más moléculas de administración específicas de tejido diseñadas para administrar el uno o más agentes farmacéuticos de la presente descripción a tejidos o tipos de células específicos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas incluyen liposomas recubiertos con un anticuerpo específico de tejido.

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada aquí 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.

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica se prepara 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 disolución acuosa, tal como agua o amortiguadores fisiológicamente compatibles, tales como disolución de Hanks, disolución de Ringer o el amortiguador 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, disoluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizadores y/o dispersantes. Ciertos disolventes adecuados para 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, tales como oleato o triglicéridos de etilo, y liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, tales suspensiones también pueden contener estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los agentes farmacéuticos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.

Una composición farmacéutica proporcionada aquí comprende el oligonucleótido modificado en una cantidad terapéuticamente eficaz. En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz 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 eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

En ciertas realizaciones, uno o más oligonucleótidos modificados para uso como se proporciona aquí se formulan como un profármaco. En ciertas realizaciones, tras la administración *in vivo*, un profármaco se convierte químicamente en la forma biológica, farmacéutica o terapéuticamente más activa del 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, tales profármacos poseen una transmisión superior a través de las membranas celulares, en las que 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.

En ciertas realizaciones, un profármaco se produce 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

5 Los tratamientos para una enfermedad asociada con miR-21 pueden comprender más de una terapia. Como tal, en ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado se usa en un método que comprende administrar al menos una terapia además de administrar el oligonucleótido modificado.

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

10 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 fármaco antiinflamatorio no esteroideo. En ciertas realizaciones, un agente antiinflamatorio no esteroideo es ibuprofeno, un inhibidor de COX-1, o un inhibidor de COX-2.

15 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.

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

25 En ciertas realizaciones, un inhibidor de ACE se administra a una dosis de 0,025 a 0,1 mg/kg de peso corporal. En ciertas realizaciones, un inhibidor de ACE se administra por ejemplo a una dosis de 0,125 a 1,0 mg/kg de peso corporal. En ciertas realizaciones, un inhibidor de ACE se administra por ejemplo a una dosis que oscila de 1 a 6 mg/m²/día. En ciertas realizaciones, un inhibidor de ACE se administra por ejemplo a una dosis que oscila de 1 a 2 mg/m²/día. En ciertas realizaciones, un inhibidor de ACE se administra por ejemplo a una dosis que oscila de 2 a 4 mg/m²/día. En ciertas realizaciones, un inhibidor de ACE se administra por ejemplo a una dosis que oscila de 0,5 a 1 mg/m²/día.

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

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

40 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, espresartán se administra a una dosis de 150 mg/m²/día.

45 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 oscila de 10 a 35 mg diarios. En ciertas realizaciones, la espironolactona se administra a una dosis de 25 mg diarios.

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

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

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

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

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.

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

Ciertos modelos experimentales

Se describen aquí métodos para usar y/o probar oligonucleótidos modificados de la presente descripción en un modelo experimental. Los expertos en la técnica pueden seleccionar y modificar los protocolos para tales modelos experimentales para evaluar un agente farmacéutico como se describe aquí.

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 aquí incluyen células primarias o cultivadas.

El grado en el que un oligonucleótido modificado interfiere con la actividad de miR-21 se puede evaluar en células cultivadas. La inhibición de la actividad de microARN puede evaluarse midiendo los niveles del microARN. Alternativamente, se puede medir el nivel de un transcrito regulado por microARN predicho o validado. Una inhibición de la actividad de microARN puede dar como resultado un aumento en el transcrito regulado por miR-21, y/o la proteína codificada por el transcrito regulado por miR-21. Además, se pueden medir ciertos resultados fenotípicos.

Varios modelos animales están disponibles para el 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 carentes del gen *Col4a3* (ratones *Col4a3^{-/-}*). La gravedad de la enfermedad en el modelo de ratón depende del antecedente genético del ratón que porta la mutación *Col4a3*. Por ejemplo, el comienzo y la progresión de la enfermedad son generalmente más rápidos en el antecedente 129X1/SvJ con respecto al C57BL/6J. En consecuencia, el antecedente genético del ratón *Col4a3^{-/-}* puede seleccionarse para variar el comienzo y la progresión de la enfermedad. Los modelos adicionales incluyen modelos caninos del síndrome de Alport autosómico recesivo o autosómico dominante, ligado al cromosoma X. Véase, por ejemplo, Kashtan, Nephrol. Transplant, 2002, 17: 1359-1361.

Ciertos ensayos de cuantificación

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. Estos métodos se usan para cuantificar niveles de microARN en células o tejidos *in vitro* o *in vivo*. Los cambios en los niveles de microARN se pueden medir mediante análisis de micromatrices. Los cambios en los niveles de microARN se miden mediante uno de varios ensayos de PCR comercialmente disponibles, tales como el ensayo de microARN TaqMan® (Applied Biosystems). La inhibición antisentido de miR-21 se puede evaluar 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 acoplamiento con la diana

La modulación de la actividad de microARN con un anti-miR o imitador de microARN puede evaluarse midiendo el acoplamiento con la diana. El acoplamiento con la diana se mide mediante un perfil de micromatrices de los ARNm. Se buscan secuencias de semilla de microARN en las secuencias de los ARNm que se modulan (aumentan o disminuyen) por el anti-miR o el imitador de microARN, para comparar la modulación de los ARNm que son dianas del microARN con la modulación de los ARNm que no son dianas de microARN. De esta manera, se puede evaluar la interacción del anti-miR con miR-21, o del imitador de miR-21 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 semilla con el microARN al que el anti-miR es complementario.

Ejemplos

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

Los ratones *Col4a3*^{-/-} en el antecedente 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.

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.

La estructura del compuesto anti-miR-21 es 5'-AECsATCsAGTCsTGAUsAAGCsTA_E-3' (SEQ ID NO: 5), en la que nucleósidos no seguidos de un subíndice indican □-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 de fosforotioato.

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 del mismo sexo se trataron 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 de 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. El plasma y los riñones se recolectaron 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.

Los criterios de valoración en sangre u orina incluyeron la medida 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.

El nitrógeno ureico en sangre (BUN) se midió en la semana 9. La significancia 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, con respecto a los animales de control tratados con PBS al final del estudio. El BUN reducido se observó en general (Figura 1A), así como sólo en ratones machos (aproximadamente 90 mg/dl en comparación con aproximadamente 25 mg/dl en ratones machos de control) y sólo en ratones hembras (aproximadamente 70 mg/dl en comparación con aproximadamente 25 mg/dl en ratones hembras de control) (no se muestra). El BUN en ratones *Col4a3*^{+/+} fue 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 reducidos, y una función mejorada.

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 de creatinina urinaria. 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, detectado por una reducción en la relación de albúmina urinaria a creatinina. Esta reducción se observó en la semana 7, y persistió hasta la semana 9. Los compañeros de camada de tipo salvaje de ratones *Col4*^{□3}^{-/-} no mostraron albuminuria, como se esperaba. La albuminuria es una medida sensible del daño glomerular y tubular. Una reducción en la relación de albúmina a creatinina indica una reducción en la enfermedad glomerular y/o tubular.

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 enmascarada de los glomérulos para las lesiones escleróticas (pérdida del asa capilar+fibrosis o hialinosis). Se puntuaron secuencialmente treinta glomérulos de cada ratón por un observador desconocedor del tratamiento. La puntuación fue de 0-4, en la que 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 *Col4a3*^{-/-} tratados con PBS y con anti-miR-21. 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 los transcritos de la principal proteína de la matriz patológica Colágeno I α 1 (Col1a1) mostró que el tejido renal de ratones *Col4a3*^{-/-} tratados con anti-miR-21 mostró mucho menos producción de este colágeno patológico (Figura 3B).

La lesión del tejido renal se evaluó en secciones de tejido fijadas con parafina y paraformaldehído (4%), teñidas por la reacción de ácido peryódico-Schiff (PAS). Inicialmente, las secciones de riñón se clasificaron para la lesión general según la lesión del túbulo y glomerular e inflamación. 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 enmascarada para la lesión general, y se les asignó una puntuación de clasificación de lesión renal. Las secciones de riñón de ratones *Col4a3*^{-/-} mostraron una puntuación de clasificación de lesión renal significativamente menor, lo que indica una menor lesión renal (Figura 4A). Para analizar esto con más detalle, los glomérulos se evaluaron por un observador desconocedor del tratamiento para la proporción que tenía medialunas glomerulares. La medialuna es una proliferación de células dentro de la cápsula de Bowman, se define por ≥ 2 capas de células dentro del espacio de Bowman. La medialuna es un marcador bien establecido de lesión glomerular. En los ratones *Col4a3*^{-/-} que recibieron anti-miR-21, la proporción de glomérulos con medialunas fue aproximadamente 44%, mientras que en los ratones que recibieron el tratamiento de control de PBS, la proporción de glomérulos con medialuna fue aproximadamente 19% (Figura 4B). En camadas *Col4a3*^{+/+}, la proporción de glomérulos con medialunas fue menor que 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 enmascarada, 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. La puntuación promedio para cada riñón se somete entonces a análisis estadístico. Como se muestra, la puntuación de lesión del túbulo fue significativamente menor en los ratones *Col4a3*^{-/-} tratados con anti-miR-21, con respecto a *Col4a3*^{-/-} que recibieron PBS (Figura 4C). La puntuación de lesión del túbulo en camadas *Col4a3*^{+/+} fue menor que 10% (no se muestra).

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 mostrado). La detección de alfa-SMA reveló una reducción en la deposición de miofibroblastos en ratones *Col4a3*^{-/-} tratados con anti-miR-21 en comparación con ratones de control *Col4a3*^{-/-} tratados con PBS (Figura 5B). En ratones *Col4a3*^{+/+}, la tinción de alfa-SMA fue aproximadamente 5% (no se muestra).

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 de orgánulos y celulares, lo que da como resultado 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 de peróxido de hidrógeno urinario fueron inferiores a 5 μ M (no mostrado). 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 mostrado). 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 de oxígeno reactivas.

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, con respecto a ratones *Col4a3*^{-/-}. MPV17L es una proteína mitocondrial de la membrana interna que está implicada en el metabolismo de las especies de oxígeno reactivas, 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, se midió la proteína PPAR-alfa mediante inmunotransferencia de los riñones de ratones

Col4a3^{-/-} tratados con PBS o con tratamiento anti-miR-21. El tratamiento anti-miR-21 aumentó la proteína PPAR-alfa, lo que sugiere una estimulación de las rutas metabólicas.

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, con respecto a 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 previniendo o reduciendo la pérdida de podocitos.

Se llevó a cabo un estudio similar usando los siguientes compuestos anti-miR-21:

compuesto anti-miR-21 #1 (más arriba): 5'-AECsATCsAGTCsTGAUsAAGCsTAE-3' (SEQ ID NO:5)

compuesto anti-miR-21 #2: 5'-AECsATCsAsGTCsUsGAUsAsAGCsUsAE-3' (SEQ ID NO: 6);

compuesto anti-miR-21 #3: 5'-^{Me}CEAsAsTECsUsAEAEUsAsAEGECSTEAs-3' (SEQ ID NO: 8); y

compuesto anti-miR-21 #4: 5'-AECsAETECsAEGETECsTGAUsAAGCsUsAs-3' (SEQ ID NO: 7); en los que los nucleósidos no seguidos de un subíndice indican □-D-desoxirribonucleósidos; los nucleósidos seguidos de un subíndice "E" indican nucleósidos 2'-MOE; los nucleósidos seguidos de un subíndice "S" indican nucleósidos S-cEt; y un superíndice "Me" indica un grupo 5-metilo en la base del nucleósido. Cada enlace internucleosídico es un enlace internucleósido de fosforotioato.

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 10 a 12 ratones. Para los compuestos #1, 2 y 4, los criterios de valoración se evaluaron como se describió anteriormente, e incluyeron BUN, relación de albúmina a creatinina urinarias, daño renal (tinción de PAS), glomeruloesclerosis, y proporción de glomérulos con medialunas. Para el compuesto #3, los criterios de valoración incluyeron BUN, relación de albúmina a creatinina urinarias, y expresión génica de colágeno (como una medida de fibrosis), evaluados como se describió anteriormente.

De acuerdo con los resultados descritos anteriormente, el compuesto anti-miR-21 #1 mejoró todos los criterios de valoración evaluados. La eficacia de ambos compuestos anti-miR-21 #2 fue similar a la del compuesto #1, con mejoras observadas en BUN, relación de albúmina a creatinina urinarias, daño renal, extensión de la glomeruloesclerosis, y porcentaje de glomérulos con medialunas. La eficacia del compuesto #3 fue similar a la del compuesto #1, con mejoras en el BUN, la relación de albúmina a creatinina urinarias, y la expresión de Col1a1. El compuesto anti-miR-21 #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 medialunas.

Tomados en conjunto, estos datos ilustran que, en un modelo de síndrome de Alport, 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

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

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

Los ratones de tipo salvaje generalmente viven 2 a 3 años (o 730 a 1095 días). En ratones Col4a3^{-/-} en un antecedente 129X1/SvJ, la insuficiencia renal de etapa terminal puede ocurrir tan pronto como a los 2 meses de edad. En Col4a3^{-/-} en un antecedente C57BL/6J, la insuficiencia renal de etapa terminal puede ocurrir tan pronto como a los 6 meses de edad. Independientemente de los antecedentes, la esperanza de vida de los ratones Col4a3^{-/-} es significativamente más corta que la de los ratones de tipo salvaje. Como tal, los ratones Col4a3^{-/-}, en cualquier antecedente genético,

pueden servir como modelo para la insuficiencia renal de etapa terminal en el síndrome de Alport, y pueden usarse para evaluar los efectos de los agentes terapéuticos candidatos en la esperanza de vida.

Los ratones se genotipan para identificar ratones *Col4a3*^{-/-}. Anti-miR-21 se administra por vía subcutánea a una dosis que oscila de 10 a 25 mg/kg, una o dos veces por semana durante hasta un año. Se puede administrar PBS 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.

Se analizan muestras de fluidos y tejidos para determinar cambios en la función renal, daño renal y esclerosis glomerular y fibrosis intersticial. Los criterios de valoración en sangre u orina incluyen la medida de nitrógeno ureico en sangre (BUN), albuminuria, relación 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.

Se observa un retraso en la aparición de insuficiencia renal de etapa terminal y una mayor esperanza de vida en ratones tratados con anti-miR-21, con respecto a 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

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*^{-/-}.

La estructura del compuesto anti-miR-21 es 5'-AECsATCsAGTCsTGAUsAAGCsTA_E-3' (SEQ ID NO: 5), en la que nucleósidos no seguidos de un subíndice indican □-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 de fosforotioato.

Se cruzaron ratones *Col4a3*^{+/-} (heterocigotos) sobre un antecedente 129X1/SvJ para generar ratones *Col4a3*^{-/-}. A las 3 semanas de edad, los ratones se genotiparon para identificar ratones *Col4a3*^{-/-}. Los grupos de tratamiento fueron: (1) ratones *Col4a3*^{+/-} (camadas 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*^{-/-}, administración de 25 mg/kg de 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. Los pesos de los animales se midieron semanalmente, y se registró la esperanza de vida.

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 esperanza de vida (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

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

La estructura del compuesto anti-miR-21 es 5'-AECsATCsAGTCsTGAUsAAGCsTA_E-3' (SEQ ID NO: 5), en la que nucleósidos no seguidos de un subíndice indican □-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 de fosforotioato.

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

(5) ratones *Col4a3*^{-/-}, administración de anti-miR-21 25 mg/kg, dos veces por semana, n = 12;

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

Como se muestra en la Figura 9A, se observó una reducción en BUN en animales tratados con anti-miR-21, con respecto a 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*^{-/-} usados 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 lesión y daño renal reducidos y una función mejorada.

Como se muestra en la Figura 9B, el tratamiento con anti-miR-21 aumentó la esperanza de vida de los ratones *Col4a3*^{-/-} de una manera sensible a la dosis. El aumento de la esperanza de vida se observó para los tratamientos tanto de dos veces por semana como de una vez por semana. La mediana de supervivencia fue como sigue: 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.

Se observó un retraso en la aparición de disfunción renal y una mayor esperanza de vida en ratones tratados con anti-miR-21, con respecto a 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 sujetos con síndrome de Alport.

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

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, 121 ra18, 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 fluoroscencia 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).

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, los animales se sacrificaron, y los riñones se recogieron y se procesaron para el análisis histológico.

Secciones de tejido renal se marcaron conjuntamente con anticuerpos específicos para varios marcadores celulares diferentes, para identificar la captación de anti-miR en tipos de células particulares. La tinción se realizó para alfa-SMA (un marcador de miofibroblastos), PDGFR-beta (un marcador de pericitos/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 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.

Como se describe aquí, la eficacia observada tras la administración de anti-miR-21 en un modelo experimental de síndrome de Alport se acompaña de mejoras no sólo 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 mejoradas del túbulo.

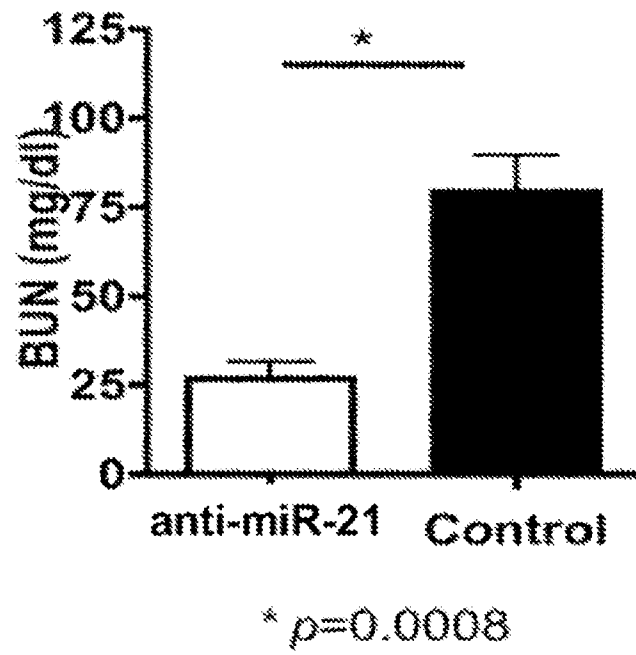
REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido modificado para uso en un método para tratar el síndrome de Alport, que comprende administrar el oligonucleótido modificado a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene síndrome de Alport, en el que el oligonucleótido modificado tiene la estructura 5'-AECsATC_sAGTC_sTGAU_sAAGC_sTA_E-3', (SEQ ID NO: 5), en la que los nucleósidos no seguidos de un subíndice son □-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 del oligonucleótido modificado es un enlace internucleosídico de fosforotioato; en el que la administración comprende administrar una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido modificado a una dosis de 110 mg.
2. El oligonucleótido modificado para uso según la reivindicación 1, en el que al sujeto se le ha diagnosticado síndrome de Alport antes de administrar el oligonucleótido modificado.
3. El oligonucleótido modificado para uso según la reivindicación 1, en el que 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.
4. El oligonucleótido modificado para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la administración:
 - a. mejora la función renal;
 - b. retrasa el inicio de la enfermedad renal de etapa terminal;
 - c. retrasa el tiempo de diálisis;
 - d. retrasa el tiempo de trasplante renal; y/o
 - e. mejora la esperanza de vida.
5. El oligonucleótido modificado para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que 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 adicional de la fibrosis; y/o
 - g. detiene la progresión adicional de la fibrosis.
6. El oligonucleótido modificado para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto:
 - (i) tiene 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 colágeno de tipo IV, o una mutación en el gen que codifica la cadena alfa 5 del colágeno de tipo IV;
 - (ii) es de sexo masculino;
 - (iii) es de sexo femenino;
 - (iv) se identifica que tiene hematuria y/o proteinuria;
 - (v) tiene una función renal reducida; y/o
 - (vi) necesita una mejor función renal.
7. El oligonucleótido modificado para uso según una 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-□-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 conjuntivo 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 el que la proteína de podocitos se selecciona de nefrina y podocina.

8. El oligonucleótido modificado para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la administración mejora uno o más marcadores de la función renal en el sujeto, seleccionados de:
- a. nitrógeno ureico en sangre reducido en el sujeto;
 - 5 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;
 - 10 g. cistatina C reducida en la sangre del sujeto;
 - h. proteína de traza β reducida en la sangre del sujeto;
 - i. 2-microglobulina reducida 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;
 - 15 l. proteína de molécula 1 de lesión renal reducida en la orina del sujeto;
 - m. proteína interleucina-18 reducida en la orina del sujeto;
 - n. niveles reducidos de proteína quimioatrayente de monocitos en la orina del sujeto;
 - o. niveles reducidos de factor de crecimiento del tejido conjuntivo en la orina del sujeto;
 - p. fragmentos reducidos de colágeno IV en la orina del sujeto;
 - 20 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 el que la proteína de podocitos se selecciona de nefrina y podocina.
9. El oligonucleótido modificado para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en el que la proteinuria es albuminuria, por ejemplo albuminuria normal alta, microalbuminuria, o macroalbuminuria.
- 25 10. El oligonucleótido modificado para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el síndrome de Alport es la forma ligada a X del síndrome de Alport o la forma autosómica del síndrome de Alport.
- 30 11. El oligonucleótido modificado para uso según la reivindicación 10, en el que:
- (i) el sujeto es de sexo masculino, y el síndrome de Alport es la forma ligada a X del síndrome de Alport;
 - (ii) el sujeto es de sexo masculino, y el síndrome de Alport es la forma autosómica del síndrome de Alport;
 - (iii) el sujeto es de sexo femenino, y el síndrome de Alport es la forma ligada a X del síndrome de Alport; o
 - 35 (iv) el sujeto es de sexo femenino, y el síndrome de Alport es la forma autosómica del síndrome de Alport.
12. El oligonucleótido modificado para uso según la reivindicación 11(ii) o la reivindicación 11(iv), en el que el sujeto tiene:
- (a) una mutación en el gen que codifica la cadena alfa 3 del colágeno de tipo IV; o
 - 40 (b) una mutación en el gen que codifica la cadena alfa 4 del colágeno de tipo IV.
13. El oligonucleótido modificado para uso según la reivindicación 10, en el que el síndrome de Alport es la forma autosómica recesiva del síndrome de Alport.
- 45 14. El oligonucleótido modificado para uso según la reivindicación 10, en el que el síndrome de Alport es la forma autosómica dominante del síndrome de Alport.
15. El oligonucleótido modificado para uso según una 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 del receptor de angiotensina II opcionalmente seleccionado de candesartán, irbesartán, olmesartán, losartán, valsartán, telmisartán, y eprosartán, un agente antihipertensivo, un análogo de la vitamina D, un aglutinante de fosfato oral, diálisis, y trasplante de riñón.
- 50

Figura 1.

A.



B.

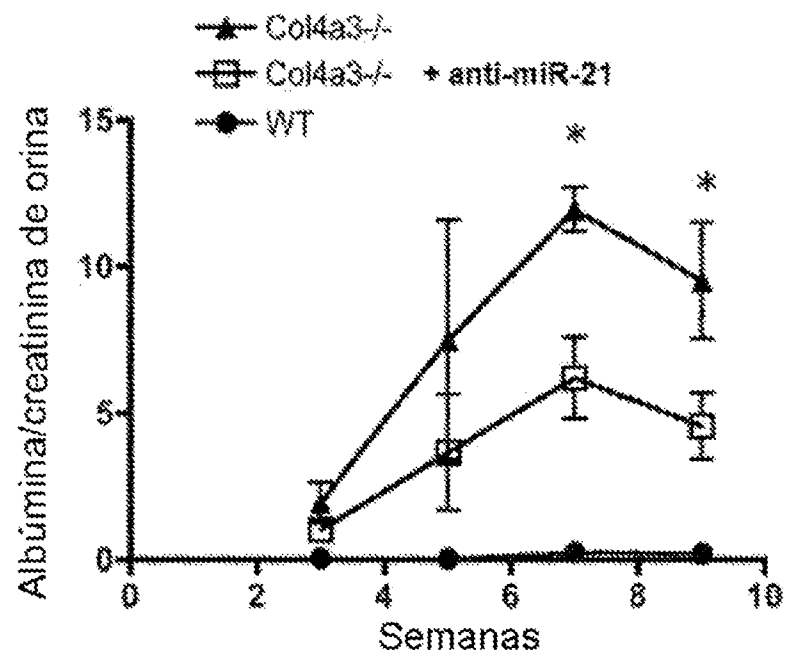


Figura 2.

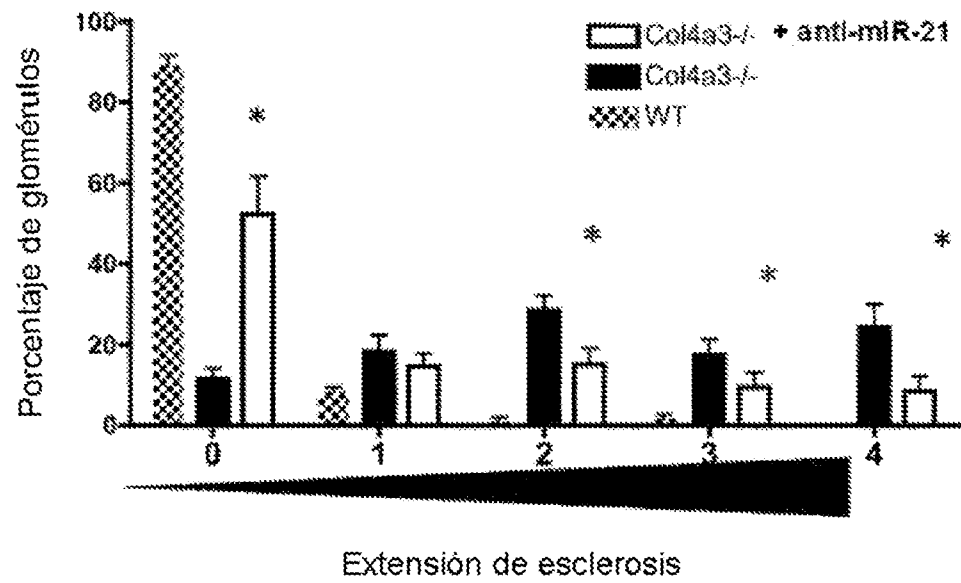
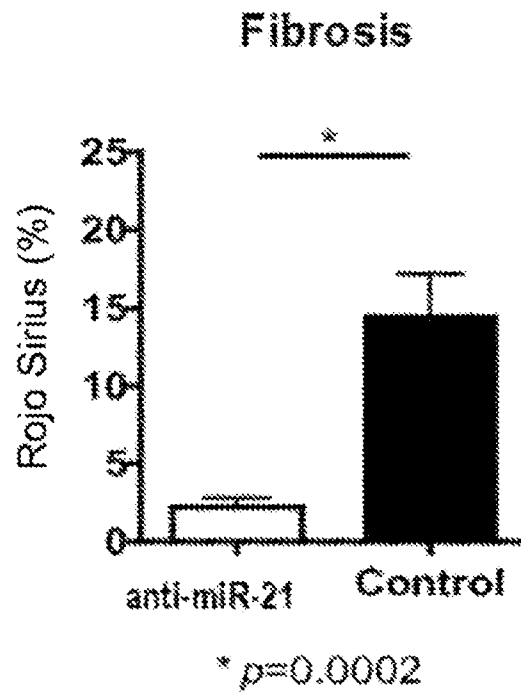


Figura 3.

A.



B.

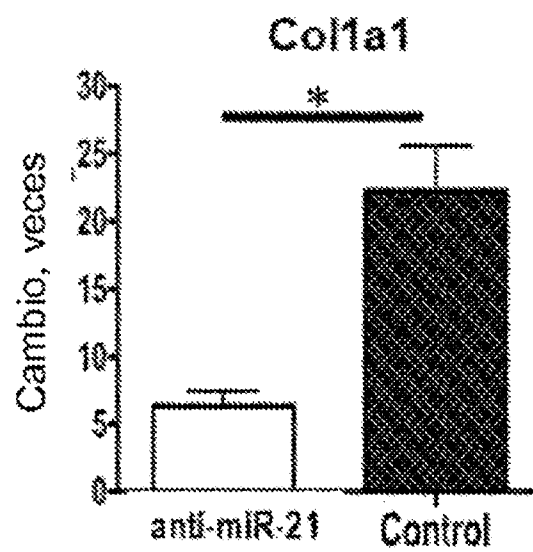
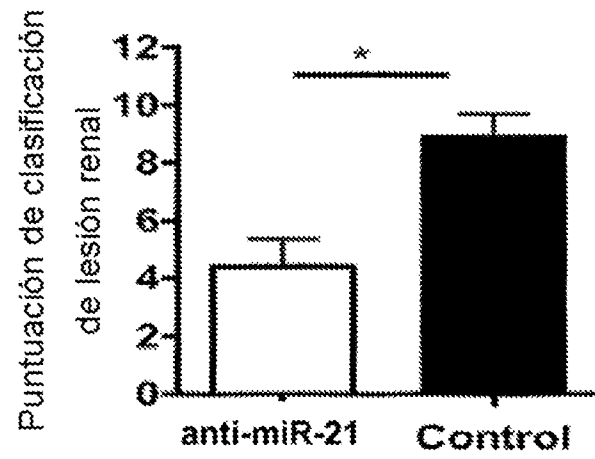
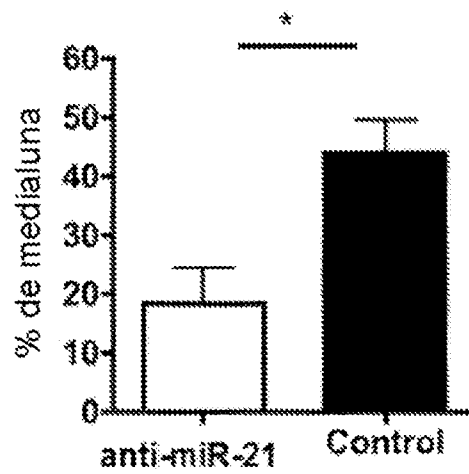


Figura 4.

A.



B.



C.

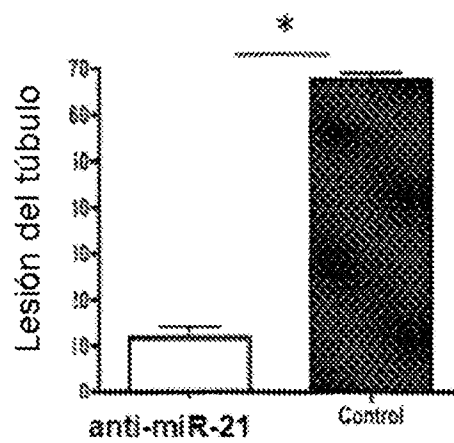
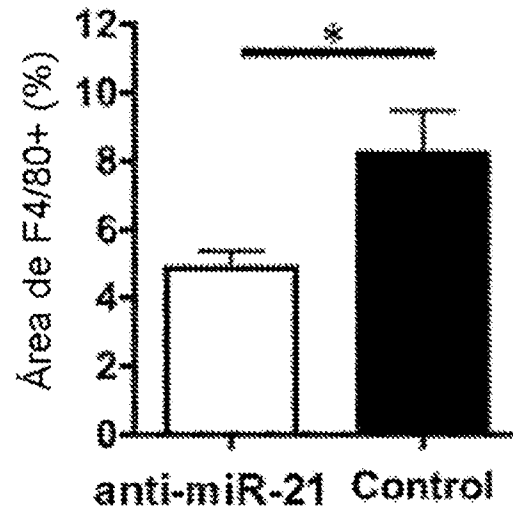


Figura 5.

A.



B.

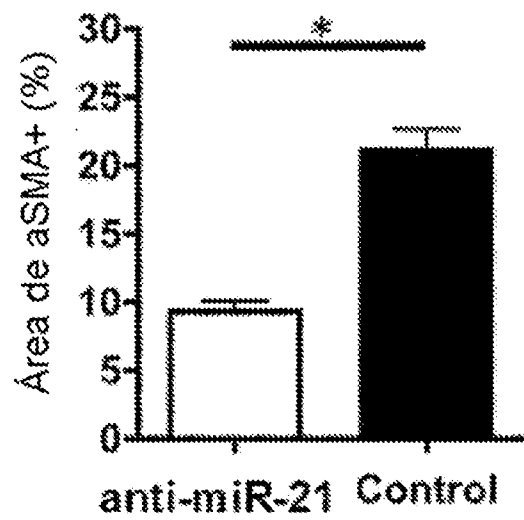
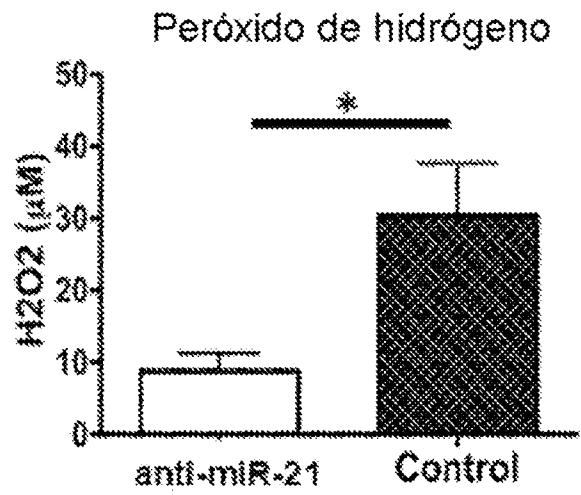


Figura 6.

A.



B.

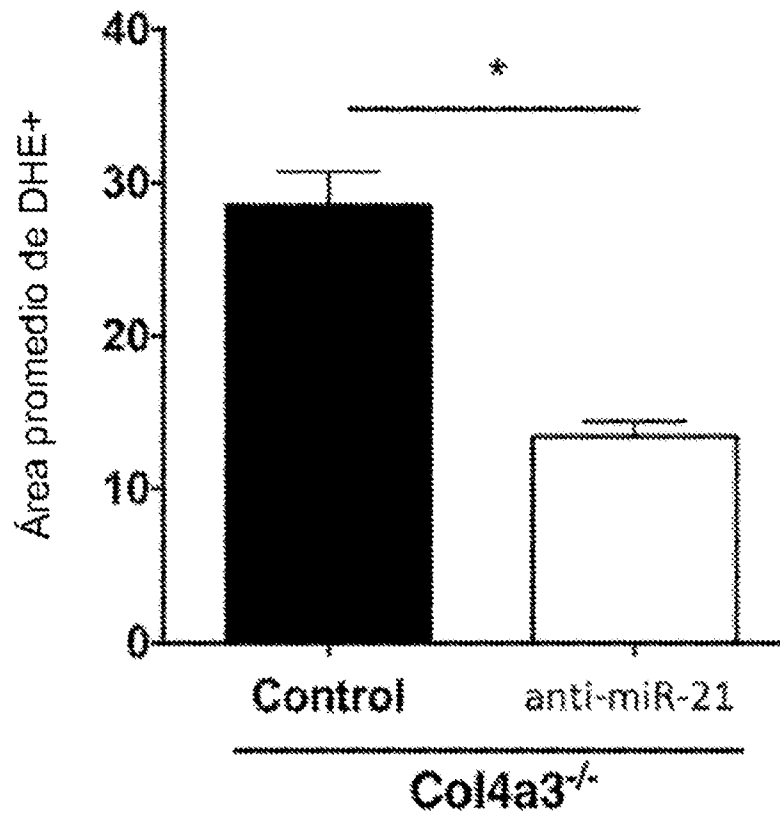


Figura 7.

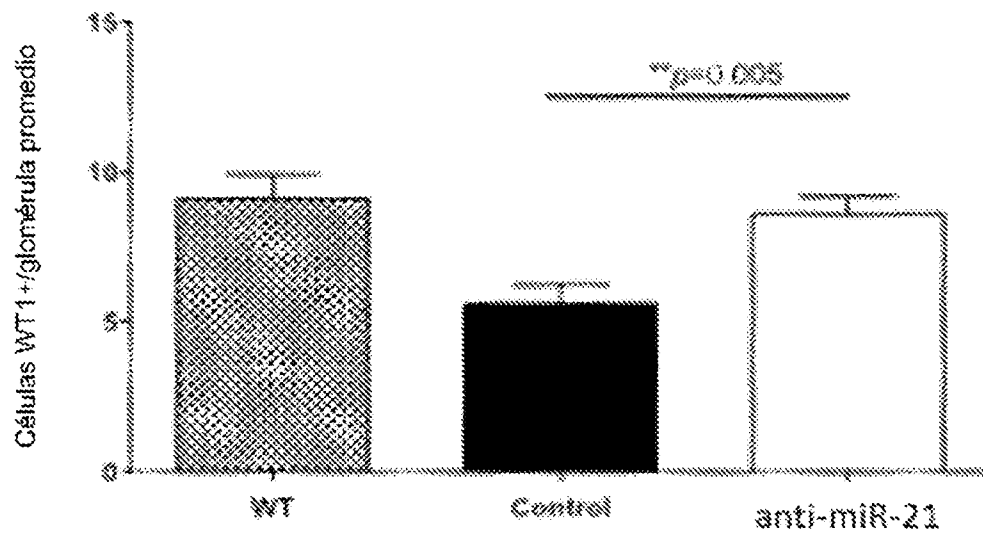
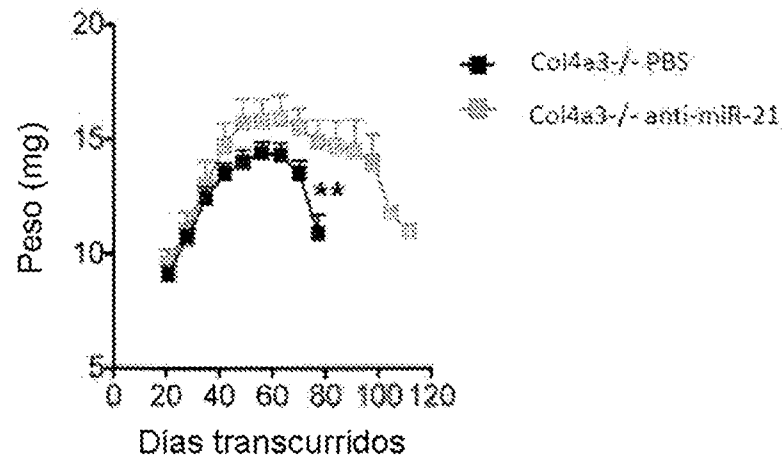


Figura 8.

A.



B.

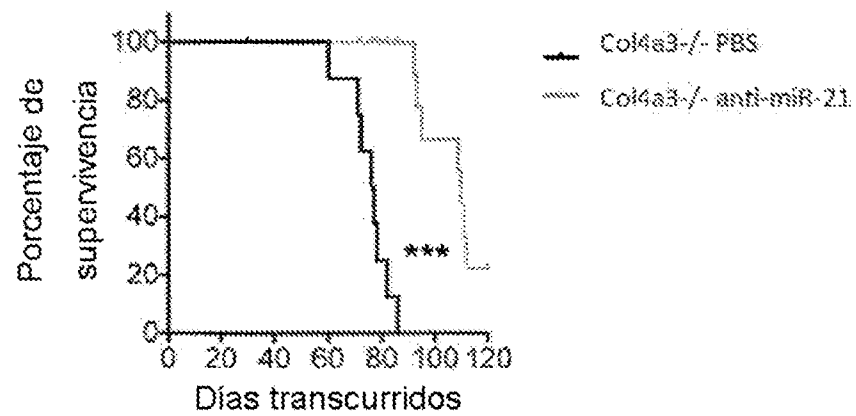
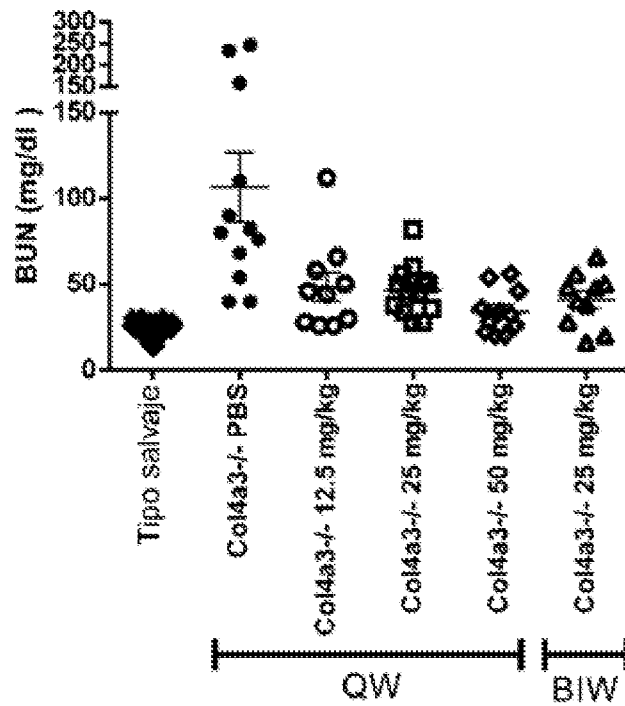


Figura 9.

A.



B.

