



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112015007709-9 B1**



**(22) Data do Depósito: 08/10/2013**

**(45) Data de Concessão: 17/05/2022**

---

**(54) Título:** USO DE UM OLIGONUCLEOTÍDEO MODIFICADO

**(51) Int.Cl.:** C12N 15/113; A61K 31/7125; A61P 13/12.

**(30) Prioridade Unionista:** 09/10/2012 US 61/711,514; 13/03/2013 US 61/779,137.

**(73) Titular(es):** SANOFI.

**(72) Inventor(es):** JEREMY DUFFIELD; BALKRISHEN BHAT; DEIDRE MACKENNA.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2013063884 de 08/10/2013

**(87) Publicação PCT:** WO 2014/058881 de 17/04/2014

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 07/04/2015

**(57) Resumo:** USO DE UM OLIGONUCLEOTÍDEO MODIFICADO NA FABRICAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA USO EM UM MÉTODO PARA TRATAR A SÍNDROME DE ALPORT, E USO DE UM OLIGONUCLETIDO MODIFICADO DE ESTRUTURA 5' -AECSATCSAGTCSTGAUSAAGCSTAE-3 São fornecidos no presente documento métodos para o tratamento da Síndrome de Alport, usando oligonucleotídeos modificados direcionados para o miR-21. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado direcionado para o miR-21 melhora a função renal e/ou reduz a fibrose em sujeitos com Síndrome de Alport. Em certas modalidades, a administração de um oligonucleotídeo modificado direcionado para o miR-21 retarda o aparecimento de doença renal em fase terminal em um sujeito com Síndrome de Alport. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado direcionado para o miR-21 retarda a necessidade de diálise ou de transplante renal em um sujeito com Síndrome de Alport.

## USO DE UM OLIGONUCLEOTÍDEO MODIFICADO

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] São fornecidos no presente documento métodos e composições para o tratamento da Síndrome de Alport.

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA RELACIONADA

[002] O colágeno do Tipo IV, um componente importante da membrana basal, é uma família de seis cadeias 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), e colágeno alfa 6 (Tipo IV). As cadeias alfa 3, alfa 4 e alfa 6 do colágeno IV são componentes fundamentais da rede de colágeno da membrana basal glomerular (GBM), que desempenha a função crítica de filtração do sangue pelos rins.

[003] A Síndrome de Alport é uma forma hereditária de doença renal em que é produzido um tipo anormal de membrana basal glomerular (GBM), levando a fibrose intersticial, esclerose glomerular e eventual perda da função renal. A doença é também frequentemente caracterizada por defeitos de audição e anomalias oculares. A Síndrome de Alport é causada por uma mutação em Col4a3, Col4a4, ou Col4a5, que codificam as cadeias alfa3(IV), alfa4(IV), e alfa5(IV) do colágeno do tipo IV, respectivamente. Mutações no gene Col4a5 no cromossomo X causam a forma ligada ao X da Síndrome de Alport, que é responsável por 85% de todos os casos da doença. Uma forma autossômica recessiva é devida a hereditariedade de mutações em cada cópia de Col4a3 ou de

Col4a4, cada uma das quais está localizada no cromossomo 2. A forma dominante autossômica rara é devida a hereditariedade de uma mutação negativa dominante no gene Col4a3 ou Col4a4. A forma ligada ao X é mais grave no sexo masculino do que no sexo feminino, com a maioria dos casos no sexo masculino a progredir para doença renal em fase terminal (ESRD). A forma autossômica é de gravidade similar no sexo masculino e feminino. A maioria dos casos da doença é devida a uma mutação herdada, mas alguns casos são devidos a uma mutação *de novo* em um dos genes *Col4aA*.

#### RESUMO DA INVENÇÃO

[004] São aqui fornecidos métodos para tratar a Síndrome de Alport, que compreendem a administração a um sujeito que tem ou se suspeita ter Síndrome de Alport, de um oligonucleotídeo modificado consistindo em 12 a 25 nucleosídeos ligados, em que a sequência de nucleobases do oligonucleotídeo modificado é complementar do miR-21. Em certas modalidades, o sujeito foi diagnosticado como tendo Síndrome de Alport antes da administração do oligonucleotídeo modificado. Em certas modalidades, antes da administração do oligonucleotídeo modificado, foi determinado que o sujeito tinha um nível aumentado de miR-21 no tecido renal. Em certas modalidades, antes da administração do oligonucleotídeo modificado, foi determinado que o sujeito tinha um nível aumentado de miR-21 na urina ou no sangue.

[005] Em qualquer uma das modalidades fornecidas no presente documento, a administração de um oligonucleotídeo modificado complementar do miR-21, a um sujeito que tem ou se suspeita ter Síndrome de Alport, pode melhorar a função renal; retardar o surgimento de doença

renal em fase terminal; retardar a necessidade de diálise; retardar a necessidade de transplante renal; e/ou melhorar a esperança de vida no sujeito.

[006] Em qualquer uma das modalidades fornecidas no presente documento, a administração de um oligonucleotídeo modificado complementar do miR-21, a um sujeito que tem ou se suspeita ter Síndrome de Alport, pode reduzir a hematúria; retardar o surgimento de hematúria; reduzir a proteinúria; retardar o surgimento de proteinúria; reduzir a fibrose renal; atrasar a progressão adicional de fibrose; e/ou parar a progressão adicional de fibrose.

[007] Em qualquer uma das modalidades proporcionadas no presente documento, o sujeito pode ter uma mutação selecionada entre uma mutação no gene que codifica a cadeia alfa 3 do colágeno do tipo IV, uma mutação no gene que codifica a cadeia alfa 4 do colágeno do tipo IV, ou uma mutação no gene que codifica a cadeia alfa 5 do colágeno do tipo IV. Em certas modalidades, o o sujeito é do sexo masculino. Em certas modalidades, o o sujeito é do sexo feminino. Em certas modalidades, o sujeito é identificado como tendo hematúria, e/ou proteinúria. Em certas modalidades, o sujeito tem função renal reduzida. Em certas modalidades, o sujeito tem necessidade de função renal melhorada.

[008] Qualquer uma das modalidades fornecidas no presente documento pode compreender a medição do nitrogênio ureico do sangue no sangue do sujeito; medição da creatinina no sangue do sujeito; medição da depuração da creatinina no sujeito; medição da proteinúria no sujeito; medição da razão albumina:creatinina no sujeito; e/ou a

medição da taxa de filtração glomerular no sujeito.

[009] Qualquer uma das modalidades fornecidas no presente documento pode compreender a medição da proteína N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) na urina do sujeito; medição da proteína lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL) na urina do sujeito; medição da proteína molécula 1 de lesão renal (KIM-1) na urina do sujeito; medição da proteína interleucina-18 (IL-18) na urina do sujeito; medição dos níveis da proteína quimioatratadora de monócitos (MCP1) na urina do sujeito; medição dos níveis de fator de crescimento tecidual conjuntivo (CTGF) na urina do sujeito; medição dos fragmentos de colágeno IV (Col IV) na urina do sujeito; medição dos fragmentos de colágeno III (Col III) na urina do sujeito; e/ou medição dos níveis de proteína nos podócitos na urina do sujeito, em que a proteína nos podócitos é selecionada entre a nefrina e a podocina. Qualquer uma das modalidades fornecidas no presente documento pode compreender a medição da proteína cistatina C no sangue de um sujeito; medição da proteína  $\beta$ -trace (BTP) no sangue de um sujeito; e a medição da 2-microglobulina (B2M) no sangue de um sujeito.

[010] Qualquer um dos métodos fornecidos no presente documento pode melhorar um ou mais marcadores da função renal no sujeito, selecionados entre a redução do nitrogênio ureico do sangue no sujeito; redução da creatinina no sangue do sujeito; melhoria da depuração da creatinina no sujeito; redução da proteinúria no sujeito; redução da razão albumina:creatinina no sujeito; e/ou melhoria da taxa de filtração glomerular no sujeito. Qualquer um dos métodos fornecidos no presente documento pode melhorar um ou mais

marcadores da função renal no sujeito, selecionados entre redução da NAG na urina do sujeito; redução da NGAL na urina do sujeito; redução da KIM-1 na urina do sujeito; redução da IL-18 na urina do sujeito; redução da MCP1 na urina do sujeito; redução do CTGF na urina do sujeito; redução dos fragmentos de colágeno IV na urina do sujeito; redução dos fragmentos de colágeno III na urina do sujeito; e redução dos níveis de proteína nos podócitos na urina do sujeito, em que a proteína nos podócitos é selecionada entre a nefrina e a podocina. Qualquer um dos métodos fornecidos no presente documento pode melhorar um ou mais marcadores da função renal selecionados entre a redução da proteína cistatina C no sangue de um sujeito; redução da proteína  $\beta$ -trace (BTP) no sangue de um sujeito; e redução da 2-microglobulina (B2M) no sangue de um sujeito.

[011] Em qualquer uma das modalidades fornecidas no presente documento, a proteinúria é albuminúria. A albuminúria pode ser albuminúria normal elevada, microalbuminúria, ou macroalbuminúria.

[012] Em certas modalidades, a Síndrome de Alport é a forma ligada ao X da Síndrome de Alport. Em certas modalidades, a Síndrome de Alport é a forma autossômica da Síndrome de Alport.

[013] Qualquer uma das modalidades fornecidas no presente documento pode compreender a administração de pelo menos uma terapia adicional selecionada entre um inibidor da enzima conversora da angiotensina II (ACE), um bloqueador do receptor da angiotensina II (ARB), um agente anti-hipertensor, um análogo da vitamina D, um ligante de fosfato oral, diálise, e transplante de rim. Em qualquer uma

dessas modalidades, os inibidores da enzima de conversão da angiotensina II (ACE) são selecionados a partir do captopril, enalapril, lisinopril, benazepril, quinapril, fosinopril, e ramipril. Em qualquer uma dessas modalidades, os bloqueadores do receptor da angiotensina II (ARB) são selecionados a partir da candesartana, irbesartana, olmesartana, losartana, valsartana, telmisartana, e eprosartana. Em qualquer uma dessas modalidades, um inibidor da ACE é selecionado entre o cilazapril, perindopril, e trandolapril.

[014] Em certas modalidades, um inibidor da ACE é administrado a uma dose que varia de 0,5 a 1 mg/m<sup>2</sup>/dia, de 1 a 6 mg/m<sup>2</sup>/dia, de 1 a 2 mg/m<sup>2</sup>/dia, de 2 a 4 mg/m<sup>2</sup>/dia, ou de 4 a 8 mg/m<sup>2</sup>/dia.

[015] Em certas modalidades, um ARB é administrado a uma dose que varia de 6,25 a 150 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em qualquer uma dessas modalidades, um ARB é administrado a uma dose de 6,25 mg/m<sup>2</sup>/dia, 10 mg/m<sup>2</sup>/dia, 12,5 mg/m<sup>2</sup>/dia, 18,75 mg/m<sup>2</sup>/dia, 37,5 mg/m<sup>2</sup>/dia, 50 mg/m<sup>2</sup>/dia, ou 150 mg/m<sup>2</sup>/dia.

[016] Em certas modalidades, a pelo menos uma terapia adicional é um antagonista da aldosterona. Em certas modalidades, um antagonista da aldosterona é a espironolactona. Em certas modalidades, a espironolactona é administrada a uma dose que varia de 10 a 35 mg por dia. Em certas modalidades, a espironolactona é administrada a uma dose de 25 mg por dia.

[017] Em qualquer uma das modalidades fornecidas no presente documento, a sequência de nucleobases do oligonucleotídeo modificado é pelo menos 90% complementar, é pelo menos 95% complementar, ou é 100% complementar da sequência de nucleobases do miR-21 (SEQ ID NO: 1).

[018] Em qualquer uma das modalidades fornecidas no presente documento, o oligonucleotídeo modificado consiste em 8 a 30, 12 a 25, ou 15 a 25 nucleosídeos ligados. Em qualquer uma das modalidades fornecidas no presente documento, o oligonucleotídeo modificado consiste em 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, ou 22 nucleosídeos ligados. Em qualquer uma das modalidades fornecidas no presente documento, o oligonucleotídeo modificado consiste em 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, ou 22 nucleosídeos ligados.

[019] Em qualquer das modalidades fornecidas no presente documento, o oligonucleotídeo modificado compreende pelo menos um nucleosídeo modificado. O nucleosídeo modificado pode ser selecionado entre um nucleosídeo S-cEt, um nucleosídeo 2'-O-metoxietila, e um nucleosídeo LNA. O oligonucleotídeo modificado pode compreender pelo menos uma ligação internucleosídica modificada. Cada ligação internucleosídica do oligonucleotídeo modificado pode ser uma ligação internucleosídica modificada. Em certas modalidades, a ligação internucleosídica modificada é uma ligação internucleosídica fosforotioato.

[020] Em qualquer uma das modalidades fornecidas no presente documento, o oligonucleotídeo modificado pode ter a estrutura 5'-AECSATCSAGTCSTGAUSAAGCSTAE-3', (SEQ ID NO: 3; em que os nucleosídeos não seguidos por um subscrito indicam  $\beta$ -D-desoxirribonucleosídeos; os nucleosídeos seguidos por um subscrito "E" indicam nucleosídeos 2'-MOE; os nucleosídeos seguidos por um subscrito "S" indicam nucleosídeos S-cEt; e cada ligação internucleosídica é uma ligação

internucleosídica fosforotioato.

[021] É fornecido no presente documento o uso de um oligonucleotídeo modificado que consiste em 8 a 30, 12 a 25, ou 15 a 25 nucleosídeos ligados, em que a sequência de nucleobases do oligonucleotídeo modificado é complementar do miR-21, para o tratamento da Síndrome de Alport.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[022] Figura 1. O anti-miR-21 melhora a função renal de ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup>. Nitrogênio ureico do sangue (BUN) às 9 semanas (A) e razão albumina/creatinina urinárias às semanas 3, 5, 7 e 9 (B). \* indica significância estatística.

[023] Figura 2. O anti-miR-21 previne a glomerulosclerose em ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup>. A glomerulosclerose foi avaliada usando escores semi-quantitativos de esclerose variando de 0 (nenhuma esclerose) a 4 (esclerose total) (n=10).

[024] Figura 3. O anti-miR-21 reduz a fibrose em ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup>. (A) Quantificação da fibrose, corada de vermelho com Picrosírius (Sírius) nos rins (n=6) e (B) PCR quantitativa de transcritos de *Colla1* normalizados para GAPDH (n=6). \* indica significância estatística.

[025] Figura 4. O anti-miR-21 reduz a classificação da lesão renal em ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup>. (A) Escore da classificação da lesão renal de seções renais de ratinhos com 9 semanas de idade. (B) Proporção de crescentes glomerulares (n=5). (C) Quantificação da lesão tubular (n=5). \* indica significância estatística.

[026] Figura 5. O anti-miR-21 reduz a infiltração de macrófagos (A) e diminui os miofibroblastos

(B) em ratinhos Col4a3<sup>-/-</sup>. (A) Quantificação da coloração de F4/80 de seções renais de ratinhos com 9 semanas de idade (n=5). (B) Quantificação da coloração de  $\alpha$ SMA de seções renais de ratinhos com 9 semanas de idade (n=5). \* indica significância estatística.

[027] Figura 6. O anti-miR-21 reduz as espécies reativas de oxigênio em ratinhos Col4a3<sup>-/-</sup>. (A) Quantificação do peróxido de hidrogênio na urina de ratinhos Col4a3<sup>-/-</sup> tratados com anti-miR-21 ou controle de PBS (n=8; \* indica significância estatística); (B) Quantificação de DES no tecido renal de ratinhos Col4a3<sup>-/-</sup> tratados com anti-miR-21 ou controle de PBS, e em ratinhos do tipo selvagem (n=3 por grupo; \*indica significância estatística).

[028] Figura 7. O anti-miR-21 melhora o número de podócitos em ratinhos Col4a3<sup>-/-</sup>. A quantificação do número de células positivas WT1 nos glomérulos de ratinhos Col4a3<sup>-/-</sup> tratados com anti-miR-21 ou controle de PBS (n=3; p=0,005).

[029] Figura 8. O anti-miR-21 aumenta o tempo de vida de ratinhos Col4a3<sup>-/-</sup>. (A) Peso de ratinhos Col4a3<sup>-/-</sup> tratados com anti-miR-21 ou controle de PBS (p < 0,01); (B) Tempo de vida de ratinhos Col4a3<sup>-/-</sup> tratados com anti-miR-21 ou controle de PBS (p < 0,001).

[030] Figura 9. O anti-miR-21 melhora a função renal e aumenta o tempo de vida de ratinhos Col4a3<sup>-/-</sup> de maneira dependente da dose (n= 10-13 por grupo de tratamento). (A) Nitrogênio ureico no sangue às 7 semanas; (B) Tempo de vida de ratinhos Col4a3<sup>-/-</sup> tratados com anti-miR-21 a múltiplas doses, uma vez por semana (QW) ou duas vezes por semana (BIW), ou com controle de PBS.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA

[031] Salvo definição em contrário, todos os termos técnicos e científicos usados no presente documento têm o mesmo significado tal como é comumente entendido por um indivíduo versado nas técnicas às quais a invenção pertence. A menos que sejam fornecidas definições específicas, a nomenclatura utilizada em conexão com, e os procedimentos e técnicas de, química analítica, química orgânica sintética, e química medicinal e farmacêutica descritos no presente documento são os bem conhecidos e comumente usados na técnica. No caso de haver uma pluralidade de definições para os termos no presente documento, as desta seção prevalecem. Podem ser usadas técnicas-padrão para a síntese química, análise química, preparação farmacêutica, formulação e administração, e tratamento de indivíduos. Algumas dessas técnicas e procedimentos podem ser encontrados, por exemplo, em "Carbohydrate Modifications in Antisense Research" Editado por Sangvi e Cook, American Chemical Society, Washington D.C., 1994; e "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., 18<sup>a</sup> edição, 1990; e são incorporadas no presente documento como referência para qualquer propósito. Quando permitido, todas as patentes, pedidos de patentes, pedidos publicados e publicações, sequências do GENBANK, sites da Web e outros materiais publicados referidos ao longo de toda a divulgação no presente documento, salvo indicação em contrário, são incorporados como referência em sua totalidade. Quando é feita referência a um URL ou a outro tal identificador ou endereço, é entendido que tais identificadores podem mudar, e que informação particular na internet pode mudar, mas que pode ser encontrada informação equivalente por pesquisa na

internet. Referência às mesmas evidencia a disponibilidade e disseminação pública de tais informações.

[032] Antes das presentes composições e métodos serem divulgados e descritos, deve entender-se que a terminologia usada no presente documento é somente para o propósito de descrever modalidades particulares e não se destina a ser limitativa. Deve notar-se que, conforme usado na especificação e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um," "uma", "a" e "o" incluem referentes plurais, a menos que o contexto claramente dite o contrário.

#### DEFINIÇÕES

[033] A Síndrome de Alport designa uma forma hereditária de doença renal em que é produzido um nível anormal de membrana basal glomerular (GBM), levando a fibrose intersticial, esclerose glomerular e eventual perda da função renal. A doença é também frequentemente caracterizada por defeitos de audição e anomalias oculares.

[034] "Hematúria" significa a presença de glóbulos vermelhos na urina.

[035] "Albuminúria" significa a presença de um excesso de albumina na urina e inclui, sem limitação, albuminúria normal, albuminúria normal elevada, microalbuminúria e macroalbuminúria. Normalmente, a barreira de permeabilidade da filtração glomerular, que é composta por podócitos, a membrana basal glomerular e as células endoteliais, impedem a passagem de proteínas séricas para a urina. A albuminúria pode refletir lesão da barreira de permeabilidade da filtração glomerular. A albuminúria pode ser calculada a partir de uma amostra de urina de 24 horas, uma amostra de urina noturna ou uma única amostra de urina.

[036] "Albuminúria normal elevada" designa uma albuminúria elevada caracterizada por (i) excreção de 15 a <30 mg de albumina para a urina em 24 horas e/ou (ii) uma razão albumina/creatinina de 1,25 a <2,5 mg/mmol (ou 10 a <20 mg/g) no sexo masculino ou 1,75 a <3,5 mg/mmol (ou 15 a <30 mg/g) no sexo feminino.

[037] "Albuminúria normal elevada" designa uma albuminúria elevada caracterizada por (i) excreção de 15 a <300 mg de albumina para a urina em 24 horas e/ou (ii) uma razão albumina/creatinina de 1,25 a <25 mg/mmol (ou 10 a <200 mg/g) no sexo masculino ou 1,75 a <35 mg/mmol (ou 15 a <300 mg/g) no sexo feminino.

[038] "Macroalbuminúria" designa uma albuminúria elevada caracterizada pela excreção de mais de 300 mg de albumina para a urina em 24 horas e/ou (ii) uma razão albumina/creatinina de >25 mg/mmol (ou >200 mg/g) no sexo masculino ou >35 mg/mmol (ou >300 mg/g) no sexo feminino.

[039] "Razão albumina/creatinina" designa a razão de albumina na urina (mg/dL) para creatinina na urina (g/dL), e é expressa como mg/g. Em certas modalidades, a razão albumina/creatinina pode ser calculada a partir de uma única amostra de urina e pode ser usada como uma estimativa da excreção de albumina durante um período de 24 horas.

[040] "Taxa de filtração glomerular estimada (eGFR) ou "taxa de filtração glomerular (GFR)" designa uma medida da eficiência de filtração de creatinina pelos rins, e é usada como estimativa da quantidade de sangue que passa pelos glomérulos por minuto. Resultados normais podem variar de 90 a 120 mL/minuto/1,73 m<sup>2</sup>. Níveis inferiores a 60

mL/minuto/1,73 m<sup>2</sup> durante 3 ou mais meses podem ser um indicador de doença renal crônica. Níveis inferiores a 15 mL/minuto/1,73 m<sup>2</sup> podem ser um indicador de insuficiência renal.

[041] "Proteinúria" designa a presença de um excesso de proteínas séricas na urina. A proteinúria pode ser caracterizada pela excreção de > 250 mg de proteínas para a urina durante 24 horas e/ou uma razão proteína para creatinina na urina de  $\geq 0,20$  mg/mg. Proteínas séricas elevadas em associação com proteinúria incluem, sem limitação, albumina.

[042] "Nitrogênio ureico no sangue" ou "BUN" designa uma medida da quantidade de nitrogênio no sangue na forma de ureia. O fígado produz ureia no ciclo da ureia como produto residual da digestão proteica, e a ureia é removida do sangue pelos rins. O sangue de um humano adulto normal pode conter entre 7 e 21 mg de nitrogênio ureico por 100 mL (7-21 mg/dL) de sangue. A medição do nitrogênio ureico no sangue é usada como um indicador da saúde renal. Se os rins não forem capazes de remover a ureia do sangue normalmente, o BUN do indivíduo aumenta.

[043] "Doença renal em fase terminal (ESRD)", designa a insuficiência completa ou quase completa da função renal.

[044] "Insuficiência renal" significa uma função renal reduzida em relação à função renal normal.

[045] "Fibrose" designa a formação ou desenvolvimento de tecido conjuntivo fibroso em excesso em um órgão ou tecido. Em certas modalidades, a fibrose ocorre como um processo reparador ou reativo. Em certas modalidades, a

fibrose ocorre em resposta a dano ou lesão. O termo "fibrose" deve ser entendido como a formação ou desenvolvimento de tecido conjuntivo fibroso em excesso em um órgão ou tecido como um processo reparador ou reativo, em oposição a uma formação de tecido fibroso como um constituinte normal de um órgão ou tecido.

[046] "Retarda a progressão adicional" significa reduzir a taxa à qual uma patologia médica segue para um estado avançado.

[047] "Pára a progressão adicional" significa interromper a progressão de uma patologia médica para um estado avançado.

[048] "Atrasar a necessidade de diálise" significa manter a função renal suficiente de modo a atrasar a necessidade de tratamento por diálise.

[049] "Atrasar a necessidade de transplante renal" significa manter a função renal suficiente de modo a atrasar a necessidade de transplante renal.

[050] "Melhora a esperança de vida" significa prolongar a vida de um indivíduo ao tratar um ou mais sintomas de uma doença no indivíduo.

[051] "Anti-miR" designa um oligonucleotídeo que tem uma sequência de nucleobases complementar de um microRNA. Em certas modalidades, um anti-miR é um oligonucleotídeo modificado.

[052] "Anti-miR-X" em que "miR-X" designa um microRNA particular, significa um oligonucleotídeo que tem uma sequência de nucleobases complementar do miR-X. Em certas modalidades, um anti-miR-X é inteiramente complementar (isto é, 100% complementar) do miR-X. Em certas modalidades, um

anti-miR-X é pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% complementar do miR-X. Em certas modalidades, um anti-miR-X é um oligonucleotídeo modificado.

[053] "miR-21" designa o miRNA maduro que tem a sequência de nucleobases UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA (SEQ ID NO: 1).

[054] "Sequência haste-laço do miR-21" designa a sequência haste-laço que tem a sequência de nucleobases UGUCGGGUAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUGAAUCUCAUGGCAACACCAGUCGAUGG GCUGUCUGACA (SEQ ID NO: 2).

[055] "Ácido nucléico alvo" designa um ácido nucléico ao qual um composto oligomérico é concebido para se hibridizar.

[056] "Direcionamento" designa o processo de concepção e seleção de uma sequência de nucleobases que se irá hibridizar com um ácido nucléico alvo.

[057] "Direcionado para" significa que tem uma sequência de nucleobases que irá permitir a hibridização com um ácido nucléico alvo.

[058] "Modulação" significa uma perturbação da função, quantidade, ou atividade. Em certas modalidades, a modulação significa um aumento na função, quantidade, ou atividade. Em certas modalidades, a modulação significa uma diminuição na função, quantidade, ou atividade.

[059] "Expressão" significa quaisquer funções e etapas, por meio das quais uma informação codificada no gene é convertida em estruturas presentes e que operam em uma célula.

[060] "Sequência de nucleobases" significa a ordem de nucleobases contíguas em um composto oligomérico ou

ácido nucléico, tipicamente listada em uma orientação 5' para 3', independente de qualquer açúcar, ligação, e/ou modificação de nucleobases.

[061] "Nucleobases contíguas" significa nucleobases imediatamente adjacentes entre si em um ácido nucléico.

[062] "Complementaridade de nucleobases" designa a capacidade de duas nucleobases para se emparelharem não covalentemente por meio de ligação de hidrogênio.

[063] "Complementar" significa que um ácido nucléico é capaz de se hibridizar com outro ácido nucléico ou oligonucleotídeo. Em certas modalidades, complementar refere-se a um oligonucleotídeo capaz de se hibridizar com um ácido nucléico alvo.

[064] "Inteiramente complementar" significa que cada nucleobase de um oligonucleotídeo é capaz de se emparelhar com uma nucleobase em cada posição correspondente em um ácido nucléico alvo. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo é inteiramente complementar de um microRNA, isto é, cada nucleobase do oligonucleotídeo é complementar de uma nucleobase em uma posição correspondente no microRNA. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo em que cada nucleobase tem complementaridade com uma nucleobase dentro de uma região de uma sequência do tipo haste-laço de microRNA é inteiramente complementar da sequência do tipo haste-laço de microRNA.

[065] "Complementaridade percentual" designa a porcentagem de nucleobases de um oligonucleotídeo que é complementar de uma porção de igual comprimento de um ácido nucléico alvo. A complementaridade percentual é calculada

dividindo-se o número de nucleobases do oligonucleotídeo que é complementar das nucleobases em posições correspondentes no ácido nucléico alvo pelo número total de nucleobases no oligonucleotídeo.

[066] "Identidade percentual" designa o número de nucleobases em um primeiro ácido nucléico que são idênticas a nucleobases em posições correspondentes em um segundo ácido nucléico, dividido pelo número total de nucleobases no primeiro ácido nucléico. Em certas modalidades, o primeiro ácido nucléico é um microRNA e o segundo ácido nucléico é um microRNA. Em certas modalidades, o primeiro ácido nucléico é um oligonucleotídeo e o segundo ácido nucléico é um oligonucleotídeo.

[067] "Hibridizar" significa o anelamento de ácidos nucléicos complementares, que ocorre através da complementaridade de nucleobases.

[068] "Incompatível/incompatibilidade" significa uma nucleobase de um primeiro ácido nucléico que não é capaz de pareamento de Watson-Crick com uma nucleobase em uma posição correspondente de um segundo ácido nucléico.

[069] "Idêntico", no contexto da sequências de nucleobases, significa que tem a mesma sequência de nucleobases, independente do açúcar, ligação, e/ou modificações de nucleobases, e independente do estado da metila de quaisquer pirimidinas presentes.

[070] "MicroRNA" designa um RNA endógeno de não codificação, entre 18 e 25 nucleobases de comprimento, que é o produto de clivagem de um pre-microRNA pela enzima Dicer. Exemplos de microRNA maduros são encontrados no banco de dados de microRNA conhecido como miRBase

(<http://microrna.sanger.ac.uk/>). Em certas modalidades, microRNA é abreviado como "microRNA" ou "miR."

[071] "Pre-microRNA" ou "pre-miR" designa um RNA de não codificação que tem uma estrutura em grampo, que é o produto da clivagem de um pri-miR pela ribonuclease específica de RNA de filamento duplo conhecida como Drosha.

[072] "Sequência do tipo haste-laço" significa um RNA que tem uma estrutura em grampo e que contém uma sequência de microRNA maduro. As sequências de pre-microRNA e as sequências do tipo haste-laço podem-se sobrepor. Exemplos de sequências do tipo haste-laço são encontrados no banco de dados de microRNA conhecido como miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>).

[073] "Pri-microRNA" ou "pri-miR" designa um RNA de não codificação que tem uma estrutura em grampo, que é um substrato para a ribonuclease específica de RNA de filamento duplo Drosha.

[074] "Precursor de microRNA" significa um transcrito que se origina de um DNA genômico e que compreende um RNA estruturado, de não codificação, que compreende uma ou mais sequências de microRNA. Por exemplo, em certas modalidades um precursor de microRNA é um pre-microRNA. Em certas modalidades, um precursor de microRNA é um pri-microRNA.

[075] "Transcrito regulado por microRNA" designa um transcrito que é regulado por um microRNA.

[076] "Sequência inicial" significa uma sequência de nucleobases que compreende de 6 a 8 nucleobases contíguas das nucleobases 1 a 9 da extremidade 5' de uma sequência de microRNA maduro.

[077] "Sequência correspondente inicial" significa uma sequência de nucleobases que é complementar de uma sequência inicial, e que tem o mesmo comprimento que a sequência inicial.

[078] "Composto oligomérico" designa um composto que compreende uma pluralidade de subunidades monoméricas ligadas. Compostos oligoméricos incluíram oligonucleotídeos.

[079] "Oligonucleotídeo" designa um composto que compreende uma pluralidade de nucleosídeos ligados, cada um dos quais pode ser modificado ou não modificado, independente um do outro.

[080] "Ligação internucleosídica que ocorre naturalmente" designa uma ligação fosfodiéster de 3' para 5' entre nucleosídeos.

[081] "Açúcar natural" significa um açúcar encontrado no DNA (2'-H) ou RNA (2'-OH).

[082] "Ligação internucleosídica" significa uma ligação covalente entre nucleosídeos adjacentes.

[083] "Nucleosídeos ligados" significa nucleosídeos juntos por uma ligação covalente.

[084] "Nucleobase" significa uma unidade heterocíclica capaz de se parear não covalentemente com outra nucleobase.

[085] "Nucleosídeo" significa uma nucleobase ligada a uma unidade de açúcar.

[086] "Nucleotídeo" significa um nucleosídeo que tem um grupo fosfato ligado covalentemente à porção de açúcar de um nucleosídeo.

[087] "Composto que compreende um

oligonucleotídeo modificado que consiste em" um número de nucleosídeos ligados, significa um composto que inclui um oligonucleotídeo modificado que tem o número especificado de nucleosídeos ligados. Assim, o composto pode incluir substituintes ou conjugados adicionais. Salvo indicação em contrário, o composto não inclui quaisquer nucleosídeos adicionais além dos do oligonucleotídeo modificado.

[088] "Oligonucleotídeo modificado" significa um oligonucleotídeo que tem uma ou mais modificações em relação a uma terminação, açúcar, nucleobase, e/ou ligação internucleosídica que ocorrem naturalmente. Um oligonucleotídeo modificado pode compreender nucleosídeos não modificados.

[089] "Oligonucleotídeo modificado de filamento único" significa um oligonucleotídeo modificado que não está hibridizado com um filamento complementar.

[090] "Nucleosídeo modificado" significa um nucleosídeo que tem qualquer mudança relativamente a um nucleosídeo que ocorre naturalmente. Um nucleosídeo modificado pode ter um açúcar modificado e uma nucleobase não modificada. Um nucleosídeo modificado pode ter um açúcar modificado e uma nucleobase modificada. Um nucleosídeo modificado pode ter um açúcar natural e uma nucleobase modificada. Em certas modalidades, um nucleosídeo modificado é um nucleosídeo bicíclico. Em certas modalidades, um nucleosídeo modificado é um nucleosídeo não bicíclico.

[091] "Ligação internucleosídica modificada" significa qualquer mudança em relação a uma ligação internucleosídica que ocorre naturalmente.

[092] "Ligação internucleosídica fosforotioato"

significa uma ligação entre nucleosídeos em que um dos átomos que não se liga em ponte é um átomo de enxofre.

[093] "Unidade de açúcar modificado" significa a substituição e/ou qualquer mudança em relação a um açúcar natural.

[094] "Nucleobase não modificada" designa as bases heterocíclicas que ocorrem naturalmente no RNA ou DNA: as bases purina, adenina (A) e guanina (G), e as bases pirimidina, timina (T), citosina (C) (incluindo a 5-metilcitosina), e uracila (U).

[095] "5-metilcitosina" designa uma citosina que compreende um grupo metila ligado à posição 5.

[096] "Citosina não metilada" designa uma citosina que não compreende um grupo metila ligado à posição 5.

[097] "Nucleobase modificada" significa qualquer nucleobase que não é uma nucleobase não modificada.

[098] "Unidade de açúcar" designa uma furanosila que ocorre naturalmente, ou uma unidade de açúcar modificada.

[099] "Unidade de açúcar modificada" significa uma unidade de açúcar substituída, ou um sucedâneo de açúcar.

[0100] "Açúcar 2'-O-metila" ou "açúcar 2'-OMe" significa um açúcar que tem uma modificação O-metila na posição 2'.

[0101] "Açúcar 2'-O-metoxietila" ou "açúcar 2'-MOE" significa um açúcar que tem uma modificação O-metoxietila na posição 2'.

[0102] "2'-fluoro" ou "2'-F" designa um açúcar que tem uma modificação fluoro na posição 2'.

[0103] "Unidade de açúcar bicíclico" significa uma unidade de açúcar modificada, que compreende um anel com 4 a 7 membros (que inclui, mas não está limitado a, uma furanosila) compreendendo uma ponte que conecta dois átomos do anel com 4 a 7 membros para formar um segundo anel, que resulta em uma estrutura bicíclica. Em certas modalidades, o anel com 4 a 7 membros é um anel de açúcar. Em certas modalidades, o anel com 4 a 7 membros é uma furanosila. Em algumas dessas modalidades, a ponte conecta o carbono 2' e o carbono 4' da furanosila. Unidades de açúcar bicíclicas exemplificativas e não limitativas incluem LNA, ENA, cEt, S-cEt e R-cEt.

[0104] "Unidade de açúcar de ácido nucléico bloqueado (LNA)" significa uma unidade de açúcar substituído, que compreende uma ponte de (CH<sub>2</sub>)-O entre os átomos 4' e 2' do anel de furanose.

[0105] "Unidade de açúcar ENA" significa uma unidade de açúcar substituído que compreende uma ponte de (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O entre os átomos 4' e 2' do anel de furanose.

[0106] "Unidade de açúcar etílico constrangido (cEt)" significa uma unidade de açúcar substituído que compreende uma ponte de CH(CH<sub>3</sub>)-O entre os átomos 4' e 2' do anel de furanose. Em certas modalidades, a ponte de CH(CH<sub>3</sub>)-O é constrangida na orientação S. Em certas modalidades, a (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O é constrangida na orientação R.

[0107] "Unidade de açúcar S-cEt" significa uma unidade de açúcar substituído que compreende uma ponte CH(CH<sub>3</sub>)-O constrangida-S entre os átomos 4' e 2' do anel de furanose.

[0108] "Unidade de açúcar R-cEt" significa uma

unidade de açúcar substituída que compreende uma ponte CH(CH<sub>3</sub>)-O constrangida-R entre os átomos 4' e 2' do anel de furanose.

[0109] "Nucleosídeo 2'-O-metila" significa um nucleosídeo modificado na posição 2', que tem uma modificação de açúcar 2'-O-metila.

[0110] "Nucleosídeo 2'-O-metoxietila" significa um nucleosídeo modificado na posição 2', que tem uma modificação de açúcar 2'-O-metoxietila. Um nucleosídeo 2'-O-metoxietila pode compreender uma nucleobase modificada ou não modificada.

[0111] "Nucleosídeo 2'-fluoro" significa um nucleosídeo modificado na posição 2', que tem uma modificação de açúcar 2'-fluoro. Um nucleosídeo 2'-fluoro pode compreender uma nucleobase modificada ou não modificada.

[0112] "Nucleosídeo bicíclico" significa um nucleosídeo modificado na posição 2', que tem uma unidade de açúcar bicíclica. Um nucleosídeo bicíclico pode ter uma nucleobase modificada ou não modificada.

[0113] "Nucleosídeo cEt" significa um nucleosídeo que compreende uma unidade de açúcar cEt. Um nucleosídeo cEt pode compreender uma nucleobase modificada ou não modificada.

[0114] "Nucleosídeo S-cEt" significa um nucleosídeo que compreende uma unidade de açúcar S-cEt.

[0115] "Nucleosídeo R-cEt" significa um nucleosídeo que compreende uma unidade de açúcar R-cEt.

[0116] "β-D-desoxirribonucleosídeo" designa um nucleosídeo de DNA que ocorre naturalmente.

[0117] "β-D-ribonucleosídeo" designa um

nucleosídeo de RNA que ocorre naturalmente.

[0118] "Nucleosídeo LNA" designa um nucleosídeo que compreende uma unidade de açúcar LNA.

[0119] "Nucleosídeo ENA" designa um nucleosídeo que compreende uma unidade de açúcar ENA.

[0120] "Sujeito" significa um humano ou animal não humano selecionado para tratamento ou terapia.

[0121] "Sujeito com necessidade do mesmo/da mesma" significa um sujeito que é identificado como tendo necessidade de uma terapia ou tratamento.

[0122] "Sujeito que se suspeita ter" significa um sujeito que exhibe um ou mais indicadores clínicos de uma doença.

[0123] "Administrar" significa fornecer uma composição ou agente farmacêutico a um sujeito, e inclui, mas não se limita, à administração por um profissional médico e à autoadministração.

[0124] "Administração parenteral" significa administração através de injeção ou infusão.

[0125] A administração parenteral inclui, mas não se limita à, administração subcutânea, administração intravenosa, e administração intramuscular.

[0126] "Administração subcutânea" significa administração logo abaixo da pele.

[0127] "Administração intravenosa" significa administração em uma veia.

[0128] "Administrado concomitantemente" refere-se à coadministração de dois ou mais agentes, de maneira a que os efeitos farmacológicos de ambos se manifestem no paciente ao mesmo tempo. A administração concomitante não

exige que ambos os agentes sejam administrados em uma única composição farmacêutica, na mesma forma de dosagem, ou pela mesma via de administração. Os efeitos de ambos os agentes não precisam se manifestar ao mesmo tempo. Os efeitos precisam somente de se sobrepor por um período de tempo e não precisam ser coextensivos.

[0129] "Duração" significa o período de tempo durante o qual uma atividade ou evento continua. Em certas modalidades, a duração do tratamento é o período de tempo durante o qual doses de um agente farmacêutico ou composição farmacêutica são administradas.

[0130] "Terapia" significa um método de tratamento de uma doença. Em certas modalidades, terapia inclui, mas não se limita a, quimioterapia, radioterapia, ou administração de um agente farmacêutico.

[0131] "Tratamento" significa a aplicação de um ou mais procedimentos específicos usados para a cura ou melhoria de uma doença. Em certas modalidades, o procedimento específico é a administração de um ou mais agente farmacêuticos.

[0132] "Melhorar" significa diminuir a gravidade de pelo menos um indicador de uma condição patológica ou doença. Em certas modalidades, a melhoria inclui um atraso ou retardamento na progressão de um ou mais indicadores de uma condição patológica ou doença. A gravidade dos indicadores pode ser determinada por meio de medições objetivas ou subjetivas, que são conhecidas dos versados na técnica.

[0133] "Em risco de desenvolver" significa o estado em que um sujeito está predisposto para desenvolver uma condição patológica ou doença. Em certas modalidades, um

sujeito em risco de desenvolver uma condição patológica ou doença exibe um ou mais sintomas da condição patológica ou doença, mas não exibe um número suficiente de sintomas para ser diagnosticado com a condição patológica ou doença. Em certas modalidades, um sujeito em risco de desenvolver uma condição patológica ou doença exibe um ou mais sintomas da condição patológica ou doença, mas numa extensão inferior à necessária para ser diagnosticado com a condição patológica ou doença.

[0134] "Prevenir o início de" significa prevenir o desenvolvimento de uma condição patológica ou doença em um sujeito que está em risco de desenvolver a doença ou condição patológica. Em certas modalidades, um sujeito em risco de desenvolver a doença ou condição patológica recebe tratamento similar ao tratamento recebido por um indivíduo que já tem a doença ou condição patológica.

[0135] "Atrasar o início de" significa retardar o desenvolvimento de uma condição patológica ou doença em um sujeito que está em risco de desenvolver a doença ou condição patológica. Em certas modalidades, um sujeito em risco de desenvolver a doença ou condição patológica recebe tratamento similar ao tratamento recebido por um indivíduo que já tem a doença ou condição patológica.

[0136] "Agente terapêutico" significa um agente farmacêutico usado para a cura, melhoria ou prevenção de uma doença.

[0137] "Dose" significa uma quantidade especificada de um agente farmacêutico fornecido em uma única administração. Em certas modalidades, uma dose pode ser administrada em dois ou mais bólus, comprimidos, ou injeções.

Por exemplo, em certas modalidades em que administração subcutânea é desejada, a dose desejada requer um volume não facilmente acomodado por uma única injeção. Em tais modalidades, podem ser usadas duas ou mais injeções para alcançar a dose desejada. Em certas modalidades, uma dose pode ser administrada em duas ou mais injeções para minimizar a reação no local da injeção em um indivíduo. Em certas modalidades, uma dose é administrada como uma infusão lenta.

[0138] "Unidade de dosagem" significa uma forma em que um agente farmacêutico é fornecido. Em certas modalidades, uma unidade de dosagem é um frasco que contém um oligonucleotídeo liofilizado. Em certas modalidades, uma unidade de dosagem é um frasco que contém um oligonucleotídeo reconstituído.

[0139] "Quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de um agente farmacêutico que fornece um benefício terapêutico a um animal.

[0140] "Composição farmacêutica" significa uma mistura de substâncias adequada para administração a um indivíduo, que inclui um agente farmacêutico. Por exemplo, uma composição farmacêutica pode compreender uma solução aquosa estéril.

[0141] "Agente farmacêutico" significa uma substância que fornece um efeito terapêutico quando administrada a um sujeito.

[0142] "Princípio farmacêutico ativo" significa a substância em uma composição farmacêutica que fornece um efeito desejado.

[0143] "Função de órgão melhorada" significa uma alteração da função do órgão em direção a limites normais. Em

certas modalidades, a função do órgão é avaliada medindo-se moléculas encontradas no sangue ou na urina de um sujeito. Por exemplo, em certas modalidades, a função renal melhorada é medida por uma redução do nitrogênio ureico no sangue, uma redução na proteinúria, uma redução na albuminúria, etc.

[0144] "Perfil de segurança aceitável" significa um padrão de efeitos colaterais que está dentro de limites clinicamente aceitáveis.

[0145] "Efeito colateral" significa uma resposta fisiológica atribuível a um tratamento diferente dos efeitos desejados. Em certas modalidades, os efeitos colaterais incluem, sem limitação, reações no sítio da injeção, anormalidades do teste da função hepática, anormalidades da função renal, toxicidade hepática, toxicidade renal, anormalidades do sistema nervoso central, e miopatias. Tais efeitos colaterais podem ser detetados direta ou indiretamente. Por exemplo, níveis de aminotransferase aumentados no soro podem indicar toxicidade hepática ou anormalidade de função hepática. Por exemplo, um aumento da bilirrubina pode indicar toxicidade hepática ou anormalidade da função hepática.

[0146] "Adesão por parte do sujeito" significa adesão por um sujeito a uma terapia recomendada ou prescrita.

[0147] "Cumprir" significa a adesão por um sujeito a uma terapia recomendada.

[0148] "Terapia recomendada" significa um tratamento recomendado por um profissional médico para tratar, melhorar, ou prevenir uma doença.

[0149] O termo "sangue", tal como usado no presente documento, abrange todo o sangue e frações

sanguíneas, tais como o soro e o plasma.

#### VISÃO GERAL

[0150] A Síndrome de Alport é uma forma hereditária de doença renal em que é produzido um nível anormal de membrana basal glomerular (GBM), levando a fibrose intersticial, esclerose glomerular e que conduz tipicamente a doença renal em fase terminal. No tratamento da Síndrome de Alport, o objetivo principal do tratamento é manter a função renal e prevenir o surgimento de doença renal em fase terminal (ESRD), o que por sua vez melhora a esperança de vida dos sujeitos com Síndrome de Alport.

[0151] A Síndrome de Alport é caracterizada por fibrose progressiva devida a defeitos na composição da GBM, sendo assim desejáveis melhorias na morfologia e função da GBM. É demonstrado no presente documento que um oligonucleotídeo modificado direcionado para o miR-21 melhora a função renal em um modelo experimental de Síndrome de Alport. Para além disso, a esclerose glomerular e a fibrose são reduzidas seguindo um tratamento anti-miR-21. É ainda demonstrado no presente documento que o anti-miR-21 melhora a sobrevivência em um modelo experimental de Síndrome de Alport. Como tal, esses oligonucleotídeos modificados direcionados para o miR-21 são úteis para o tratamento da Síndrome de Alport.

#### CERTOS USOS DA INVENÇÃO

[0152] São fornecidos no presente documento, métodos para o tratamento da Síndrome de Alport que compreendem a administração a um sujeito que tem ou se suspeita ter Síndrome de Alport, de um oligonucleotídeo modificado complementar do miR-21.

[0153] Em certas modalidades, o sujeito foi diagnosticado como tendo Síndrome de Alport antes da administração do oligonucleotídeo modificado. O diagnóstico da Síndrome de Alport pode ser feito por avaliação de parâmetros que incluem, sem limitação, o historial médico da família do sujeito, características clínicas (incluindo, sem limitação, proteinúria, albuminúria, hematúria, GFR comprometida, surdez e/ou alterações oculares) e resultados de biópsias teciduais. As biópsias renais podem ser testadas quanto à presença ou ausência das cadeias alfa 3, alfa 4 e alfa 5 do colágeno do tipo IV. Adicionalmente, podem ser detetadas alterações estruturais glomerulares por microscopia eletrônica de material de biópsia renal. Uma biópsia da pele pode ser testada quanto à presença da cadeia alfa 5 do colágeno do tipo IV, que normalmente está presente na pele e quase sempre ausente em sujeitos do sexo masculino com a forma ligada ao X da Síndrome de Alport. O diagnóstico da Síndrome de Alport pode também incluir rastreamento de mutações em um ou mais dos genes Col4a3, Col4a4 ou Col4a5.

[0154] Em certas modalidades, os níveis de miR-21 estão aumentados nos rins de um sujeito que tem Síndrome de Alport. Em certas modalidades, antes da administração, determina-se que um indivíduo tem um nível aumentado de miR-21 nos rins. Os níveis de miR-21 podem ser medidos a partir de material de biópsia renal. Em certas modalidades, antes da administração, é determinado que o sujeito tem um nível aumentado de miR-21 na urina ou no sangue.

[0155] Em certas modalidades, a administração de um oligonucleotídeo modificado complementar do miR-21 resulta em um ou mais resultados clinicamente benéficos. Em certas

modalidades, a administração melhora a função renal. Em certas modalidades, a administração atrasa o surgimento de doença renal em fase terminal. Em certas modalidades, a administração atrasa a necessidade de diálise. Em certas modalidades, a administração atrasa a necessidade de transplante renal. Em certas modalidades, a administração melhora a esperança de vida do sujeito.

[0156] Em certas modalidades, a administração reduz a fibrose renal. Em certas modalidades, a administração retarda a progressão adicional da fibrose renal. Em certas modalidades, a administração pára a progressão adicional da fibrose renal. Em certas modalidades, a administração reduz a hematúria. Em certas modalidades, a administração atrasa o surgimento de hematúria. Em certas modalidades, a administração reduz a proteinúria. Em certas modalidades, a administração atrasa o surgimento de proteinúria.

[0157] O sujeito que tem ou se suspeita ter Síndrome de Alport pode ter uma mutação no gene que codifica a cadeia alfa 3 do colágeno do tipo IV (Col4a3), uma mutação no gene que codifica a cadeia alfa 4 do colágeno do tipo IV (Col4a4), ou uma mutação no gene que codifica a cadeia alfa 5 do colágeno do tipo IV (Col4a5). Em certas modalidades, o o sujeito é do sexo masculino. Em certas modalidades, o o sujeito é do sexo feminino.

[0158] Em certas modalidades, o sujeito tem insuficiência renal. Em certas modalidades, o sujeito tem necessidade de melhorar a função renal. Em certas modalidades, o sujeito é identificado como tendo insuficiência renal. Em certas modalidades, o sujeito é identificado como tendo hematúria. Em certas modalidades, o

sujeito é identificado como tendo proteinúria.

[0159] Em qualquer das modalidades proporcionadas no presente documento, um sujeito pode ser submetido a certos testes para se avaliar a função renal. Tais testes incluem, sem limitação, a medição do nitrogênio ureico no sangue do sujeito; medição da creatinina no sangue do sujeito; medição da depuração da creatinina no sangue do sujeito; medição da proteinúria no sujeito; medição da razão albumina:creatinina no sujeito; medição da taxa de filtração glomerular no sujeito; e a medição do débito urinário no sujeito.

[0160] Em qualquer das modalidades proporcionadas no presente documento, as proteínas presentes na urina ou no sangue podem ser usadas para avaliar a função renal. Tais testes da função renal incluem, mas não estão limitados à, medição da proteína N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) na urina do sujeito; medição da proteína lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL) na urina do sujeito; medição da proteína molécula 1 de lesão renal (KIM-1) na urina do sujeito; medição da proteína interleucina-18 (IL-18) na urina do sujeito; medição dos níveis de fator de crescimento tecidual conjuntivo (CTGF) na urina do sujeito; medição dos níveis de proteína quimioatratadora de monócitos (MCP1) na urina do sujeito; medição dos fragmentos de colágeno IV (Col IV) na urina do sujeito; medição dos fragmentos de colágeno III (Col III) na urina do sujeito; medição da proteína cistatina C no sangue do sujeito; medição da proteína e/ou medição dos níveis de proteína  $\beta$ -trace (BTP) no sangue de um sujeito; e medição da 2-microglobulina (B2M) no sangue de um sujeito. Em qualquer das modalidades

fornecidas no presente documento, os marcadores de lesão de podócitos podem ser medidos na urina. Tais proteínas incluem a nefrina e a podocina. As proteínas podem ser quantificadas, por exemplo, por meio de ensaio imunossorbente ligado à enzima (ELISA), ou radioimunoensaio (RIA) usando *kits* disponíveis comercialmente.

[0161] Em qualquer uma das modalidades fornecidas no presente documento, a administração de um oligonucleotídeo modificado direcionado para o miR-21 melhora um ou mais marcadores da função renal no indivíduo. As melhorias nos marcadores da função renal incluem, sem limitação, a diminuição do nitrogênio ureico no sangue do sujeito; redução da creatinina no sangue do sujeito; melhoria da depuração da creatinina no sujeito; redução da proteinúria no sujeito; redução da razão albumina:creatinina no sujeito; melhoria da taxa de filtração glomerular no sujeito; e/ou aumento do débito urinário no sujeito.

#### CERTAS TERAPIAS ADICIONAIS

[0162] Os tratamentos para a Síndrome de Alport ou quaisquer condições patológicas listadas no presente documento podem compreender mais que uma terapia. Como tal, em certas modalidades do presente documento são proporcionados métodos para tratar um sujeito que tem ou se suspeita ter Síndrome de Alport, que compreendem a administração de pelo menos uma terapia para além da administração de um oligonucleotídeo modificado que tem uma sequência de nucleobases complementar de um miR-21.

[0163] Em certas modalidades, a pelo menos uma terapia adicional compreende um agente farmacêutico.

[0164] Em certas modalidades, os agentes

farmacêuticos incluem bloqueadores do receptor da angiotensina II (ARB). Em certas modalidades, um bloqueador do receptor da angiotensina II é a candesartana, irbesartana, olmesartana, losartana, valsartana, telmisartana, ou a eprosartana.

[0165] Em certas modalidades, os agentes farmacêuticos incluem inibidores da enzima conversora da angiotensina II (ACE). Em certas modalidades, um inibidor da ACE é o captopril, enalapril, lisinopril, benazepril, quinapril, fosinopril, ou o ramipril.

[0166] Em certas modalidades, um agente farmacêutico é um agente anti-hipertensor. Os agentes anti-hipertensores são usados para controlar a pressão arterial do sujeito.

[0167] Em certas modalidades, um agente farmacêutico é um análogo da vitamina D. Os análogos da vitamina D podem ser usados para limitar a produção do hormônio paratiroide no sujeito.

[0168] Em certas modalidades, um agente farmacêutico é um ligante de fosfato oral que reduz a absorção de fosfato da alimentação.

[0169] Em certas modalidades, os agentes farmacêuticos incluem agentes imunossupressores. Em certas modalidades, um agente imunossupressor é um corticosteroide, ciclofosfamida, ou micofenolato de mofetila.

[0170] Em certas modalidades, um agente farmacêutico é a ciclosporina, um inibidor da HMG-Coenzima A, um inibidor da vasopectidase, ou um antagonista do TGF-beta.

[0171] Em certas modalidades, uma terapia adicional é uma terapia genética. Em certas modalidades, a

terapia genética fornece um gene Col4a3 normal. Em certas modalidades, a terapia genética fornece um gene Col4a4 normal. Em certas modalidades, a terapia genética fornece um gene Col4a5 normal.

[0172] Em certas modalidades, uma terapia adicional é a diálise. Em certas modalidades, uma terapia adicional é o transplante renal.

[0173] Em certas modalidades, os agentes farmacêuticos incluem agentes anti-inflamatórios. Em certas modalidades, um agente anti-inflamatório é um agente anti-inflamatório esteroide. Em certas modalidades, um agente anti-inflamatório esteroide é um corticosteroide. Em certas modalidades, um corticosteroide é a prednisona. Em certas modalidades, um agente anti-inflamatório é um agente anti-inflamatório não esteroide. Em certas modalidades, um agente anti-inflamatório não esteroide é o ibuprofeno, um inibidor da COX-I, ou um inibidor da COX-2.

[0174] Em certas modalidades, um agente farmacêutico é um agente farmacêutico que bloqueia uma ou mais respostas a sinais fibrogênicos.

[0175] Em certas modalidades, os agentes farmacêuticos incluem um agente antidiabético. Os agentes antidiabéticos incluem, mas não estão limitados a, biguanidas, inibidores da glucosidase, insulinas, sulfonilureias e tiazolidenodionas.

#### CERTAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOBASES DE MICRORNA

[0176] Os oligonucleotídeos modificados descritos no presente documento têm uma sequência de nucleobases que é complementar do miR-21 (SEQ ID NO: 1), ou de um precursor do mesmo (SEQ ID NO: 2). Em determinadas

modalidades, cada nucleobase do oligonucleotídeo modificado tem a capacidade de sofrer emparelhamento de bases com uma nucleobase em cada posição correspondente na sequência de nucleobases do miR-21, ou de um precursor do mesmo. Em determinadas modalidades, a sequência de nucleobases de um oligonucleotídeo modificado pode ter um ou mais pares de bases não compatíveis em relação à sequência de nucleobases do miR-21 ou a uma sequência precursora, e permanece capaz de se hibridizar com a sua sequência-alvo.

[0177] Como a sequência do miR-21 está contida na sequência do precursor do miR-21, um oligonucleotídeo modificado que tem uma sequência de nucleobases complementar do miR-21 também é complementar de uma região do precursor do miR-21.

[0178] Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em diversos nucleosídeos ligados que têm comprimento igual ao miR-21.

[0179] Em determinadas modalidades, o número de nucleosídeos ligados de um oligonucleotídeo modificado é inferior ao comprimento do miR-21. Um oligonucleotídeo modificado que tem um número de nucleosídeos ligados que é inferior ao comprimento do miR-21, em que cada nucleobase do oligonucleotídeo modificado é complementar de cada nucleobase em uma posição correspondente do miR-21, é considerado um oligonucleotídeo modificado que tem uma sequência de nucleobases que é completamente complementar de uma região da sequência do miR-21. Por exemplo, um oligonucleotídeo modificado que consiste em 19 nucleosídeos ligados, onde cada nucleobase é complementar de uma posição correspondente do miR-21 que tem 22 nucleobases de comprimento, é completamente

complementar de uma região de 19 nucleobases do miR-21. Um tal oligonucleotídeo modificado tem 100% de complementaridade com uma porção de 19 nucleobases do miR-21, e é considerado como sendo 100% complementar do miR-21.

[0180] Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado compreende uma sequência de nucleobases que é complementar de uma sequência inicial, isto é, um oligonucleotídeo modificado compreende uma sequência correspondente inicial. Em certas modalidades, uma sequência inicial é uma sequência inicial de hexâmero. Em algumas dessas modalidades, uma sequência inicial consiste nas nucleobases 1-6 do miR-21. Em algumas dessas modalidades, uma sequência inicial consiste nas nucleobases 2-7 do miR-21. Em algumas dessas modalidades, uma sequência inicial consiste nas nucleobases 3-8 do miR-21. Em certas modalidades, uma sequência inicial é uma sequência inicial de heptâmero. Em algumas dessas modalidades, uma sequência inicial de heptâmero consiste nas nucleobases 1-7 do miR-21. Em algumas dessas modalidades, uma sequência inicial de heptâmero consiste nas nucleobases 2-8 do miR-21. Em certas modalidades, a sequência inicial é uma sequência inicial de octâmero. Em algumas dessas modalidades, uma sequência inicial de octâmero consiste nas nucleobases 1-8 do miR-21. Em algumas dessas modalidades, uma sequência inicial de octâmero consiste nas nucleobases 2-9 do miR-21.

[0181] Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado tem uma sequência de nucleobases que tem uma incompatibilidade no que diz respeito à sequência de nucleobases do miR-21, ou de um precursor do mesmo. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado tem uma

sequência de nucleobases que tem duas incompatibilidades no que diz respeito à sequência de nucleobases do miR-21, ou de um precursor do mesmo. Em algumas dessas modalidades, um oligonucleotídeo modificado tem uma sequência de nucleobases que não tem mais de duas incompatibilidades no que diz respeito à sequência de nucleobases do miR-21, ou de um precursor do mesmo. Em algumas dessas modalidades, as nucleobases incompatíveis são contíguas. Em algumas dessas modalidades, as nucleobases incompatíveis não são contíguas.

[0182] Em determinadas modalidades, o número de nucleosídeos ligados de um oligonucleotídeo modificado é superior ao comprimento do miR-21. Em algumas dessas modalidades, a nucleobase de um nucleosídeo adicional é complementar de uma nucleobase da sequência laço-haste do miR-21. Em determinadas modalidades, o número de nucleosídeos ligados de um oligonucleotídeo modificado é superior ao comprimento do miR-21. Em algumas dessas modalidades, o nucleosídeo adicional está na extremidade 5' de um oligonucleotídeo. Em algumas dessas modalidades, o nucleosídeo adicional está na extremidade 3' de um oligonucleotídeo. Em determinadas modalidades, o número de nucleosídeos ligados de um oligonucleotídeo modificado é duas vezes superior ao comprimento do miR-21. Em algumas dessas modalidades, os dois nucleosídeos adicionais estão na extremidade 5' de um oligonucleotídeo. Em algumas dessas modalidades, os dois nucleosídeos adicionais estão na extremidade 3' de um oligonucleotídeo. Em algumas dessas modalidades, um nucleosídeo adicional está localizado na extremidade 5' e um nucleosídeo adicional está localizado na extremidade 3' de um oligonucleotídeo. Em determinadas

modalidades, uma região do oligonucleotídeo pode ser completamente complementar da sequência de nucleobases do miR-21, mas o oligonucleotídeo completo modificado não é completamente complementar do miR-21. Por exemplo, um oligonucleotídeo modificado que consiste em 24 nucleosídeos ligados, em que as nucleobases dos nucleosídeos 1 a 22 são, cada uma delas, complementares de uma posição correspondente do miR-21 que tem 22 nucleobases de comprimento, tem uma porção de 22 nucleosídeos que é completamente complementar da sequência de nucleobases do miR-21 e aproximadamente 92% complementar globalmente da sequência de nucleobases do miR-21.

#### CERTOS OLIGONUCLEOTÍDEOS MODIFICADOS

[0183] Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado tem a estrutura 5'-AECSATCSAGTCSTGAUSAAGCSTAE-3' (SEQ ID NO: 3), em que os nucleosídeos não seguidos por um subscrito indicam  $\beta$ -D-desoxirribonucleosídeos; os nucleosídeos seguidos por um subscrito "E" indicam nucleosídeos 2'-MOE; os nucleosídeos seguidos por um subscrito "S" indicam nucleosídeos S-cEt; e cada ligação internucleosídica é uma ligação internucleosídica fosforotioato.

[0184] Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado tem a estrutura 5'-AECSATCSASGTCSUSGAUSASAGCSUsAE-3' (SEQ ID NO: 3), em que os nucleosídeos não seguidos por um subscrito indicam  $\beta$ -D-desoxirribonucleosídeos; os nucleosídeos seguidos por um subscrito "E" indicam nucleosídeos 2'-MOE; os nucleosídeos seguidos por um subscrito "S" indicam nucleosídeos S-cEt; e cada ligação internucleosídica é uma ligação

internucleosídica fosforotioato.

[0185] Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado tem a estrutura 5'-MeCEASASTECSUSAEAEUSASAEGECSTEAS-3' (SEQ ID NO: 4), em que os nucleosídeos não seguidos de um subscrito indicam  $\beta$ -D-desoxirribonucleosídeos; os nucleosídeos seguidos de um subscrito "E" indicam nucleosídeos 2'-MOE; os nucleosídeos seguidos de um subscrito "S" indicam nucleosídeos S-cEt; um superescrito "Me" indica um grupo 5-metila na base do nucleosídeo; e cada ligação internucleosídica é uma ligação internucleosídica fosforotioato.

[0186] Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado tem a estrutura 5'-AECSAETECSEAEGETECSTGAUSAAGCSUSAS-3' (SEQ ID NO: 3), em que os nucleosídeos não seguidos por um subscrito indicam  $\beta$ -D-desoxirribonucleosídeos; os nucleosídeos seguidos por um subscrito "E" indicam nucleosídeos 2'-MOE; os nucleosídeos seguidos por um subscrito "S" indicam nucleosídeos S-cEt; e cada ligação internucleosídica é uma ligação internucleosídica fosforotioato.

[0187] Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado compreende uma ou mais 5-metilcitosinas. Em certas modalidades, cada citosina de um oligonucleotídeo modificado compreende uma 5-metilcitosina.

[0188] Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 8 a 30 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 12 a 25 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 15 a 30 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um

oligonucleotídeo modificado consiste em 15 a 25 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 15 a 19 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 15 a 16 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 19 a 24 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 21 a 24 nucleosídeos ligados.

[0189] Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 8 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 9 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 10 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 11 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 12 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 13 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 14 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 15 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 16 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 17 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 18 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 19 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 20 nucleosídeos

ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 21 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 22 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 23 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 24 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado consiste em 25 nucleosídeos ligados.

#### CERTAS MODIFICAÇÕES

[0190] Em certas modalidades, os oligonucleotídeos fornecidos no presente documento podem compreender uma ou mais modificações em uma nucleobase, açúcar e/ou ligação internucleosídica, e como tal são oligonucleotídeos modificados. Uma nucleobase, açúcar e/ou ligação internucleosídica modificados podem ser selecionados entre formas não modificadas devido a propriedades desejáveis tais como, por exemplo, absorção celular reforçada, afinidade reforçada para com outros oligonucleotídeos ou alvos de ácidos nucleicos, e estabilidade aumentada na presença de nucleases.

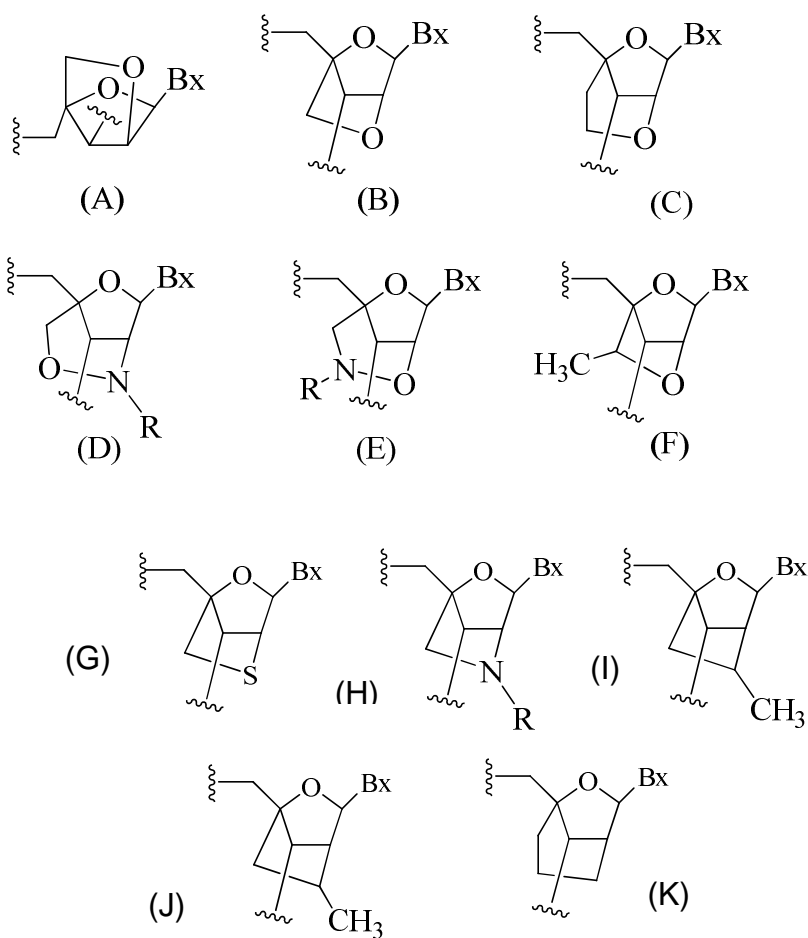
[0191] Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado compreende um ou mais nucleosídeos modificados. Em algumas dessas modalidades, um nucleosídeo modificado é um nucleosídeo estabilizador. Um exemplo de um nucleosídeo estabilizador é um nucleosídeo modificado com um açúcar.

[0192] Em certas modalidades, um nucleosídeo modificado é um nucleosídeo modificado com um açúcar. Em algumas dessas modalidades, os nucleosídeos modificados com

um açúcar podem compreender adicionalmente uma unidade de uma base heterocíclica modificada ou natural e/ou uma ligação internucleosídica modificada ou natural, e podem incluir modificações adicionais independentes da modificação de açúcar. Em certas modalidades, um nucleosídeo modificado com um açúcar é um nucleosídeo modificado na posição 2', em que o anel de açúcar é modificado no carbono 2' a partir da ribose ou da 2'-desoxirribose natural.

[0193] Em certas modalidades, um nucleosídeo modificado na posição 2' tem uma unidade de açúcar bicíclica. Em algumas dessas modalidades, a unidade de açúcar bicíclica é um açúcar D na configuração alfa. Em algumas dessas modalidades, a unidade de açúcar bicíclica é um açúcar D na configuração beta. Em algumas dessas modalidades, a unidade de açúcar bicíclica é um açúcar L na configuração alfa. Em algumas dessas modalidades, a unidade de açúcar bicíclica é um açúcar L na configuração beta.

[0194] Os nucleosídeos que compreendem tais unidades bicíclicas de açúcar são referidos como nucleosídeos bicíclicos ou BNA. Em certas modalidades, os nucleosídeos bicíclicos incluem, mas não estão limitados a, (A)  $\alpha$ -L-Metilenoxi (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA; (B)  $\beta$ -D-Metilenoxi (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA; (C) Etilenoxi (4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2') BNA; (D) Aminooxi (4'-CH<sub>2</sub>-O-N(R)-2') BNA; (E) Oxiamino (4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2') BNA; (F) Metil(metileneoxi) (4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2') BNA (também referido como etila constrangida ou cEt); (G) metileno-tio (4'-CH<sub>2</sub>-S-2') BNA; (H) metileno-amino (4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-2') BNA; (I) metilcarbocíclico (4'-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-2') BNA; (J) c-MOE (4'-CH<sub>2</sub>-OMe-2') BNA e (K) propilenocarbocíclico (4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-2') BNA conforme representado abaixo.



[0195] em que Bx é uma unidade de nucleobase e R é, independentemente, H, um grupo de proteção, ou uma alquila C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>.

[0196] Em determinadas modalidades, um nucleosídeo modificado na posição 2' compreende um grupo de substituição na posição 2' selecionado a partir de F, OCF<sub>3</sub>, O-CH<sub>3</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(H)CH<sub>3</sub>.

[0197] Em certas modalidades, um nucleosídeo modificado na posição 2' compreende um grupo substituinte na posição 2' selecionado a partir de F, O-CH<sub>3</sub> e OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>.

[0198] Em certas modalidades, um nucleosídeo modificado com um açúcar é um nucleosídeo modificado 4'-tio. Em certas modalidades, um nucleosídeo modificado com um açúcar é um nucleosídeo modificado 4'-tio-2'. Um nucleosídeo modificado com 4'-tio tem um  $\beta$ -D-ribonucleosídeo onde 4'-O é substituído por 4'-S. Um nucleosídeo modificado com 4'-tio-2'- é um nucleosídeo modificado com 4'-tio que tem 2'-OH substituído por um grupo substituinte na posição 2'. Grupos substituintes adequados para a posição 2' incluem 2'-OCH<sub>3</sub>, 2'-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub> e 2'-F.

[0199] Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado compreende uma ou mais modificações internucleosídicas. Em algumas dessas modalidades, cada ligação internucleosídica de um oligonucleotídeo modificado é uma ligação internucleosídica modificada. Em certas modalidades, a ligação internucleosídica modificada compreende um átomo de fósforo.

[0200] Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado compreende pelo menos uma ligação internucleosídica fosforotioato. Em algumas modalidades, cada ligação internucleosídica de um oligonucleotídeo modificado é uma ligação internucleosídica fosforotioato.

[0201] Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado compreende uma ou mais nucleobases modificadas. Em certas modalidades, uma nucleobase modificada é selecionada entre a 5-hidroximetilcitosina, 7-desazaguanina e 7-desazaadenina. Em certas modalidades, uma nucleobase modificada é selecionada entre a 7-desazaadenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina e 2-piridona. Em certas modalidades, uma nucleobase modificada

é selecionada entre pirimidinas substituídas na posição 5, 6-azapirimidinas e purinas N-2, N-6 e O-6 substituídas, incluindo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracila e 5-propinilcitosina.

[0202] Em certas modalidades, uma nucleobase modificada compreende um heterociclo policíclico. Em certas modalidades, uma nucleobase modificada compreende um heterociclo tricíclico. Em certas modalidades, uma nucleobase modificada compreende um derivado fenoxazina. Em certas modalidades, a fenoxazina pode ser modificada adicionalmente para formar uma nucleobase conhecida na técnica como um grampo em G.

[0203] Em certas modalidades, um oligonucleotídeo modificado é conjugado a uma ou mais unidades que potenciam a atividade, distribuição celular ou absorção celular dos oligonucleotídeos antissentido resultantes. Em algumas dessas modalidades, a unidade é uma unidade colesterol. Em algumas dessas modalidades, a unidade é uma unidade lipídica. As unidades adicionais para conjugação incluem carboidratos, fosfolipídeos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, coumarinas e corantes. Em certas modalidades, a unidade carboidrato é a N-acetil-D-galactosamina (GalNac). Em certas modalidades, um grupo conjugado está ligado diretamente a um oligonucleotídeo. Em determinadas modalidades, um grupo conjugado está ligado a um oligonucleotídeo modificado por uma unidade de ligação selecionada entre amino, hidroxila, ácido carboxílico, tiol, insaturações (p.ex., ligações duplas ou triplas), ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (ADO), 4-(N-

maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidila (SMCC), ácido 6-aminohexanoico (AHEX ou AHA), alquila C1-C10 substituída, alquenila C2-C10 substituída ou não substituída, e alquinila C2-C10 substituída ou não substituída. Em algumas dessas modalidades, um grupo substituinte é selecionado a partir de hidroxila, amino, alcóxi, carboxi, benzila, fenila, nitro, tiol, tioalcoxi, halogênio, alquila, arila, alquenila e alquinila.

[0204] Em algumas dessas modalidades, o composto compreende um oligonucleotídeo modificado que tem um ou mais grupos estabilizantes que estão ligados a uma ou a ambas as extremidades de um oligonucleotídeo modificado para potencializar propriedades tais como, por exemplo, a estabilidade das nucleases. São incluídas nos grupos estabilizantes estruturas de tampa. Essas modificações terminais protegem um oligonucleotídeo modificado da degradação da exonuclease, e podem auxiliar na entrega e/ou localização dentro de uma célula. A tampa pode estar presente na extremidade 5' (tampa 5') ou na extremidade 3' (tampa 3'), ou pode estar presente em ambas as extremidades. As estruturas de tampa incluem, por exemplo, tampas abásicas desoxi invertidas.

#### CERTAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

[0205] São fornecidas no presente documento composições farmacêuticas que compreendem oligonucleotídeos. Em determinadas modalidades, uma composição farmacêutica fornecida no presente documento compreende um composto que compreende um oligonucleotídeo modificado que consiste em 15 a 25 nucleosídeos ligados, e que tem uma sequência de nucleobases complementar do miR-21. Em determinadas modalidades, uma composição farmacêutica fornecida no

presente documento compreende um composto que consiste em um oligonucleotídeo modificado, consistindo em 8 a 30 nucleosídeos ligados, e que tem uma sequência de nucleobases complementar do miR-21. Em determinadas modalidades, uma composição farmacêutica fornecida no presente documento compreende um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que consiste em 12 a 25 nucleosídeos ligados, e com uma sequência de nucleobases complementar do miR-21.

[0206] As vias de administração adequadas incluem, mas não estão limitadas a, oral, retal, transmucosa, intestinal, entérica, tópica, por supositório, através de inalação, intratecal, intracardíaca, intraventricular, intraperitoneal, intranasal, intraocular, intratumoral e parenteral (p.ex., intravenosa, intramuscular, intramedular, e subcutânea). Em certas modalidades, os agentes farmacêuticos intratecais são administrados para se conseguirem exposições locais ao invés de exposições sistêmicas. Por exemplo, as composições farmacêuticas podem ser injetadas diretamente na área de efeito desejado (p.ex., nos rins).

[0207] Em certas modalidades, uma composição farmacêutica é administrada na forma de uma unidade de dosagem (p.ex., comprimido, cápsula, bólus, etc.). Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica compreende um oligonucleotídeo modificado a uma dose dentro de um intervalo selecionado entre 25 mg a 800 mg, 25 mg a 700 mg, 25 mg a 600 mg, 25 mg a 500 mg, 25 mg a 400 mg, 25 mg a 300 mg, 25 mg a 200 mg, 25 mg a 100 mg, 100 mg a 800 mg, 200 mg a 800 mg, 300 mg a 800 mg, 400 mg a 800 mg, 500 mg a 800 mg, 600 mg a 800 mg, 100 mg a 700 mg, 150 mg a 650 mg, 200 mg a 600 mg, 250 mg

a 550 mg, 300 mg a 500 mg, 300 mg a 400 mg, e 400 mg a 600 mg. Em certas modalidades, tais composições farmacêuticas compreendem um oligonucleotídeo modificado a uma dose selecionada entre 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 55 mg, 60 mg, 65 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 85 mg, 90 mg, 95 mg, 100 mg, 105 mg, 110 mg, 115 mg, 120 mg, 125 mg, 130 mg, 135 mg, 140 mg, 145 mg, 150 mg, 155 mg, 160 mg, 165 mg, 170 mg, 175 mg, 180 mg, 185 mg, 190 mg, 195 mg, 200 mg, 205 mg, 210 mg, 215 mg, 220 mg, 225 mg, 230 mg, 235 mg, 240 mg, 245 mg, 250 mg, 255 mg, 260 mg, 265 mg, 270 mg, 275 mg, 280 mg, 285 mg, 290 mg, 295 mg, 300 mg, 305 mg, 310 mg, 315 mg, 320 mg, 325 mg, 330 mg, 335 mg, 340 mg, 345 mg, 350 mg, 355 mg, 360 mg, 365 mg, 370 mg, 375 mg, 380 mg, 385 mg, 390 mg, 395 mg, 400 mg, 405 mg, 410 mg, 415 mg, 420 mg, 425 mg, 430 mg, 435 mg, 440 mg, 445 mg, 450 mg, 455 mg, 460 mg, 465 mg, 470 mg, 475 mg, 480 mg, 485 mg, 490 mg, 495 mg, 500 mg, 505 mg, 510 mg, 515 mg, 520 mg, 525 mg, 530 mg, 535 mg, 540 mg, 545 mg, 550 mg, 555 mg, 560 mg, 565 mg, 570 mg, 575 mg, 580 mg, 585 mg, 590 mg, 595 mg, 600 mg, 605 mg, 610 mg, 615 mg, 620 mg, 625 mg, 630 mg, 635 mg, 640 mg, 645 mg, 650 mg, 655 mg, 660 mg, 665 mg, 670 mg, 675 mg, 680 mg, 685 mg, 690 mg, 695 mg, 700 mg, 705 mg, 710 mg, 715 mg, 720 mg, 725 mg, 730 mg, 735 mg, 740 mg, 745 mg, 750 mg, 755 mg, 760 mg, 765 mg, 770 mg, 775 mg, 780 mg, 785 mg, 790 mg, 795 mg, e 800 mg. Em algumas dessas modalidades, uma composição farmacêutica da presente invenção compreende uma dose de oligonucleotídeo modificado selecionada entre 25 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, e 800mg.

[0208] Em certas modalidades, um agente

farmacêutico é um oligonucleotídeo modificado, liofilizado e estéril, que é reconstituído com um diluente adequado, p.ex., água estéril para injeção ou soro fisiológico estéril para injeção. O produto reconstituído é administrado como uma injeção subcutânea ou uma infusão intravenosa após a diluição em soro fisiológico. O produto farmacológico liofilizado consiste em um oligonucleotídeo modificado que foi preparado em água para injeção, ou em soro fisiológico para injeção, ajustado a pH de 7,0-9,0 com ácido ou base durante a preparação e, então, liofilizado. O oligonucleotídeo modificado liofilizado pode ser 25-800 mg de um oligonucleotídeo. Entende-se que este abrange 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, e 800 mg de oligonucleotídeo modificado liofilizado. Para além disso, em algumas modalidades, o oligonucleotídeo modificado liofilizado é uma quantidade de um oligonucleotídeo dentro de um intervalo selecionado entre 25 mg a 800 mg, 25 mg a 700 mg, 25 mg a 600 mg, 25 mg a 500 mg, 25 mg a 400 mg, 25 mg a 300 mg, 25 mg a 200 mg, 25 mg a 100 mg, 100 mg a 800 mg, 200 mg a 800 mg, 300 mg a 800 mg, 400 mg a 800 mg, 500 mg a 800 mg, 600 mg a 800 mg, 100 mg a 700 mg, 150 mg a 650 mg, 200 mg a 600 mg, 250 mg a 550 mg, 300 mg a 500 mg, 300 mg a 400 mg, e 400 mg a 600 mg. O produto farmacológico liofilizado pode ser embalado num frasco de vidro transparente (tratado com sulfato de amônio) de 2 mL, do Tipo I, com uma rolha de borracha de bromobutila e selado com uma cápsula de alumínio FLIP-OFF®.

[0209] Em certas modalidades, as composições farmacêuticas fornecidas no presente documento podem conter

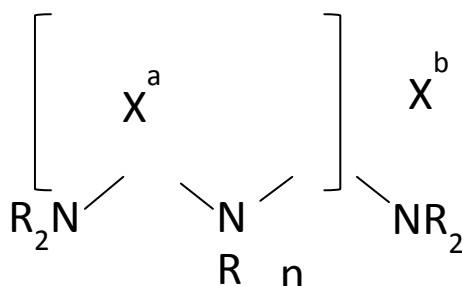
adicionalmente outros componentes adjuntos encontrados convencionalmente em composições farmacêuticas, aos seus níveis de uso estabelecidos pela técnica. Assim, por exemplo, as composições podem conter materiais farmacêuticamente ativos adicionais, compatíveis, tais como, por exemplo, agentes antipruriginosos, adstringentes, anestésicos locais ou agentes anti-inflamatórios, ou podem conter materiais adicionais úteis para formular fisicamente várias formas de dosagem das composições da presente invenção, tais como corantes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espessantes e estabilizadores. No entanto, tais materiais, quando adicionados, não devem interferir indevidamente com as atividades biológicas dos componentes das composições da presente invenção. As formulações podem ser esterilizadas e, se desejado, misturadas com agentes auxiliares, p.ex., lubrificantes, conservantes, estabilizadores, agentes umectantes, emulsificantes, sais para influenciar a pressão osmótica, tampões, corantes, aromatizantes e/ou substâncias aromáticas e similares, que não interagem de modo prejudicial com o(s) oligonucleotídeo(s) da formulação.

[0210] As unidades lipídicas têm sido usadas em terapias de ácidos nucleicos em uma variedade de métodos. Em um método, o ácido nucleico é introduzido em lipossomas pré-formados ou em lipoplexos feitos de misturas de lipídeos catiônicos e lipídeos neutros. Em um outro método, os complexos de DNA com lipídeos mono ou policatiônicos são formados sem a presença de um lipídeo neutro. Em certas modalidades, é selecionada uma unidade lipídica para aumentar a distribuição de um agente farmacêutico em uma célula ou

tecido particular. Em certas modalidades, é selecionada uma unidade lipídica para aumentar a distribuição de um agente farmacêutico em um tecido graxo. Em certas modalidades, é selecionada uma unidade lipídica para aumentar a distribuição de um agente farmacêutico em um tecido muscular.

[0211] Em certas modalidades, o INTRALIPID é usado para preparar uma composição farmacêutica que compreende um oligonucleotídeo. O Intralipid é uma emulsão de gordura preparada para administração intravenosa. O mesmo é constituído por 10% de óleo de soja, 1,2% de fosfolipídios de gema de ovo, 2,25% de glicerina e água para injeção. Adicionalmente, foi adicionado hidróxido de sódio para ajustar o pH de modo a que o intervalo de pH do produto final seja de 6 a 8,9.

[0212] Em certas modalidades, uma composição farmacêutica fornecida no presente documento compreende um composto de poliamina ou uma unidade lipídica complexada com um ácido nucleico. Em certas modalidades, tais preparações compreendem um ou mais compostos, tendo cada um individualmente uma estrutura definida pela fórmula (Z) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo,



[0213] em que cada  $X^a$  e  $X^b$ , para cada ocorrência,

é independentemente um alquileno  $C_{1-6}$ ;  $n$  é 0, 1, 2, 3, 4 ou 5; cada  $R$  é independentemente  $H$ , em que pelo menos  $n + 2$  das unidades  $R$  em pelo menos cerca de 80% das moléculas do composto da fórmula (Z) na preparação não são  $H$ ;  $m$  é 1, 2, 3 ou 4;  $Y$  é  $O$ ,  $NR^2$  ou  $S$ ;  $R^1$  é uma alquila, alquenila ou alquinila; cada uma das quais é opcionalmente substituída com um ou mais substituintes; e  $R^2$  é  $H$ , uma alquila, alquenila ou alquinila; cada uma das quais é opcionalmente substituída com um ou mais substituintes; desde que, se  $n = 0$ , então pelo menos  $n + 3$  das unidades  $R$  não sejam  $H$ . Tais preparações são descritas na publicação PCT WO/2008/042973, que é incorporada no presente documento na sua totalidade a título de referência para a divulgação de preparações lipídicas. Determinadas preparações adicionais são descritas em Akinc et al., *Nature Biotechnology* 26, 561-569 (01 de maio de 2008), que é incorporado no presente documento na sua totalidade a título de referência, para a divulgação de preparações lipídicas.

[0214] Em certas modalidades, as composições farmacêuticas fornecidas no presente documento compreendem um ou mais oligonucleotídeos modificados e um ou mais excipientes. Em algumas dessas modalidades, os excipientes são selecionados entre água, soluções salinas, álcool, polietilenoglicóis, gelatina, lactose, amilase, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulose e polivinilpirrolidona.

[0215] Em certas modalidades, uma composição farmacêutica fornecida no presente documento é preparada usando técnicas conhecidas, incluindo, mas não limitadas a, processos de mistura, dissolução, granulação, formação de

drageias, levigação, emulsificação, encapsulamento, aprisionamento ou formação de comprimidos.

[0216] Em certas modalidades, uma composição farmacêutica fornecida no presente documento é um líquido (p.ex., uma suspensão, elixir e/ou solução). Em algumas dessas modalidades, uma composição farmacêutica líquida é preparada usando ingredientes conhecidos na técnica, incluindo, mas não imitados a, água, glicos, óleos, alcoóis, agentes aromatizantes, conservantes e agentes de coloração.

[0217] Em certas modalidades, uma composição farmacêutica fornecida no presente documento é um sólido (p.ex., um pó, comprimido, e/ou uma cápsula). Em algumas dessas modalidades, uma composição farmacêutica sólida compreendendo um ou mais oligonucleotídeos é preparada usando ingredientes conhecidos na técnica, incluindo, mas não imitados a, amidos, açúcares, diluentes, agentes de granulação, lubrificantes, ligantes, e agentes desintegrantes.

[0218] Em certas modalidades, uma composição farmacêutica fornecida no presente documento é formulada como uma preparação de depósito. Algumas dessas preparações de depósito têm tipicamente ação mais duradoura que as preparações de não depósito. Em certas modalidades, tais preparações são administradas por implantação (por exemplo subcutânea ou intramuscularmente) ou por injeção intramuscular. Em certas modalidades, as preparações de depósito são preparadas usando materiais poliméricos ou hidrofóbicos adequados (por exemplo uma emulsão em um óleo aceitável) ou resinas de troca de íons, ou como derivados pouco solúveis, por exemplo, como um sal pouco solúvel.

[0219] Em certas modalidades, uma composição farmacêutica fornecida no presente documento compreende um sistema de entrega. Exemplos de sistemas de entrega incluem, mas não estão limitados a, lipossomas e emulsões. Determinados sistemas de entrega são úteis para preparar determinadas composições farmacêuticas incluindo aquelas que compreendem compostos hidrofóbicos. Em certas modalidades, são usados determinados solventes orgânicos tais como o dimetilsulfóxido.

[0220] Em certas modalidades, uma composição farmacêutica fornecida no presente documento compreende uma ou mais moléculas de entrega específicas para tecidos concebidas para entregar o ou os agentes farmacêuticos da presente invenção em tecidos ou tipos de células específicos. Por exemplo, em certas modalidades, as composições farmacêuticas incluem lipossomas revestidos com um anticorpo específicos para tecidos.

[0221] Em certas modalidades, uma composição farmacêutica fornecida no presente documento compreende um sistema de liberação sustentada. Um exemplo não limitativo de um tal sistema de liberação sustentada é uma matriz semipermeável de polímeros hidrofóbicos sólidos. Em certas modalidades, os sistemas de liberação sustentada podem, dependendo de sua natureza química, liberar agentes farmacêuticos ao longo de um período de horas, dias, semanas ou meses.

[0222] Em certas modalidades, uma composição farmacêutica é preparada para administração por injeção (p.ex., intravenosa, subcutânea, intramuscular, etc.). Em algumas dessas modalidades, uma composição farmacêutica

compreende um veículo e é formulada em solução aquosa tal como água, ou em tampões fisiologicamente compatíveis tais como solução de Hanks, solução de Ringer ou tampão de soro fisiológico. Em certas modalidades, são incluídos outros ingredientes (p.ex., ingredientes que auxiliam na solubilidade ou servem como conservantes). Em certas modalidades, as suspensões injetáveis são preparadas usando veículos líquidos apropriados, agentes de suspensão e similares. Determinadas composições farmacêuticas para injeção são apresentadas na forma de dosagem unitária, p.ex., em ampolas ou recipientes de múltiplas doses. Determinadas composições farmacêuticas para injeção são suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e podem conter agentes de formulação tais como agentes de suspensão, estabilizantes e/ou dispersantes. Determinados solventes adequados para o uso em composições farmacêuticas para injeção incluem, mas não se limitam a, solventes lipofílicos e óleos graxos tais como óleo de sésamo, ésteres de ácidos graxos sintéticos tais como oleato de etila ou triglicerídeos, e lipossomas. As suspensões de injeção aquosas podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão tais como carboximetilcelulose de sódio, sorbitol ou dextrano. Opcionalmente, tais suspensões podem também conter estabilizantes adequados ou agentes que aumentam a solubilidade dos agentes farmacêuticos para permitir a preparação de soluções altamente concentradas.

[0223] Em certas modalidades, uma composição farmacêutica fornecida no presente documento compreende um oligonucleotídeo modificado em uma quantidade terapeuticamente eficaz. Em certas modalidades, a quantidade

terapeuticamente eficaz é suficiente para prevenir, aliviar ou melhorar os sintomas de uma doença ou prolongar a sobrevivência do sujeito a ser tratado. A determinação de uma quantidade terapêuticamente eficaz está bem dentro da capacidade dos peritos na técnica.

[0224] Em certas modalidades, um ou mais oligonucleotídeos modificados fornecidos no presente documento são formulados como um pró-fármaco. Em certas modalidades, após a administração *in vivo*, um pró-fármaco é quimicamente convertido na forma biológica, farmacêutica ou terapêuticamente mais ativa de um oligonucleotídeo. Em certas modalidades, os pró-fármacos são úteis porque são mais fáceis de administrar que a forma ativa correspondente. Por exemplo, em determinadas situações, um pró-fármaco pode estar mais biodisponível (p. ex., por administração oral) do que a forma ativa correspondente. Em determinados casos, um pró-fármaco pode ter uma solubilidade melhorada em comparação com a forma ativa correspondente. Em certas modalidades, os pró-fármacos são mesmos solúveis em água do que a forma ativa correspondente. Em determinadas situações, tais pró-fármacos possuem transmissão superior através das membranas celulares, onde a solubilidade em água é prejudicial à mobilidade. Em certas modalidades, um pró-fármaco é um éster. Em algumas dessas modalidades, o éster é metabolicamente hidrolisado a ácido carboxílico após administração. Em certos casos, o ácido carboxílico que contém o composto é a forma ativa correspondente. Em certas modalidades, um pró-fármaco compreende um peptídeo curto (poliaminoácido) ligado a um grupo ácido. Em algumas dessas modalidades, o peptídeo é clivado após administração para formar a forma ativa

correspondente.

[0225] Em certas modalidades, um pró-fármaco é produzido modificando-se um composto farmacologicamente ativo, de tal modo que o composto ativo seja regenerado por administração *in vivo*. O pró-fármaco pode ser concebido para alterar a estabilidade metabólica ou as características de transporte de um fármaco, para mascarar os efeitos colaterais ou a toxicidade, para melhorar o sabor de um fármaco ou para alterar outras características ou propriedades de um fármaco. Em virtude do conhecimento dos processos farmacodinâmicos e metabolismo dos fármacos *in vivo*, os peritos nesta técnica, uma vez conhecido um composto farmacologicamente ativo, podem conceber pró-fármacos do composto (ver, p.ex., Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, Nova Iorque, páginas 388-392).

#### CERTAS TERAPIAS ADICIONAIS

[0226] Os tratamentos para uma doença associada ao miR-21 podem compreender mais de uma terapia. Como tal, em certas modalidades são proporcionadas no presente documento métodos para tratar um sujeito que tem ou se suspeita ter uma doença associada ao miR-21, que compreendem a administração de pelo menos uma terapia para além da administração de um oligonucleotídeo modificado que tem uma sequência de nucleobases complementar do miRNA.

[0227] Em certas modalidades, a pelo menos uma terapia adicional compreende um agente farmacêutico.

[0228] Em certas modalidades, os agentes farmacêuticos incluem agentes anti-inflamatórios. Em certas modalidades, um agente anti-inflamatório é um agente anti-inflamatório esteroide. Em certas modalidades, um agente

anti-inflamatório esteroide é um corticosteroide. Em certas modalidades, um corticosteroide é a prednisona. Em certas modalidades, um agente anti-inflamatório é um fármaco anti-inflamatório não esteroide. Em certas modalidades, um agente anti-inflamatório não esteroide é o ibuprofeno, inibidores da COX-I, ou inibidores da COX-2.

[0229] Em certas modalidades, os agentes farmacêuticos incluem agentes antidiabéticos. Os agentes antidiabéticos incluem, mas não estão limitados a, biguanidas, inibidores da glucosidase, insulinas, sulfonilureias e tiazolidenodionas.

[0230] Em determinadas modalidades, os agentes farmacêuticos incluem, mas não estão limitados a, diuréticos (p.ex., esprionolactona, eplerenona, furosemida), inotrópicos (p.ex. dobutamina, milrinona), digoxina, vasodilatadores, inibidores de enzima de conversão de angiotensina II (ACE) (p.ex., são o captopril, enalapril, lisinopril, benazepril, quinapril, fosinopril e ramipril), bloqueadores de receptor de angiotensina II (ARB) (p.ex., candesartana, irbesartana, olmesartana, losartana, valsartana, telmisartana, eprosartana), bloqueadores dos canais de cálcio, dinitrato de isossorbida, hidralazina, nitratos (p.ex., mononitrato de isossorbida, dinitrato de isossorbida), hidralazina, betabloqueadores (p.ex., carvedilol, metoprolol) e peptídeos natriuréticos (p.ex., nesiritida). Em certas modalidades, um inibidor da ACE é selecionado entre o cilazapril, perindopril, e o trandolapril.

[0231] Em certas modalidades, um inibidor da ACE é administrado a uma dose de 0,025 a 0,1 mg/kg de peso corporal. Em certas modalidades, um inibidor da ACE é

administrado a uma dose de 0,125 a 1,0 mg/kg de peso corporal. Em certas modalidades, um inibidor da ACE é administrado a uma dose que varia de 1 a 6 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em certas modalidades, um inibidor da ACE é administrado a uma dose que varia de 1 a 2 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em certas modalidades, um inibidor da ACE é administrado a uma dose que varia de 2 a 4 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em certas modalidades, um inibidor da ACE é administrado a uma dose que varia de 0,5 a 1 mg/m<sup>2</sup>/dia.

[0232] Em certas modalidades, o ramipril é administrado a uma dose que varia de 1 a 6 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em certas modalidades, o ramipril é administrado a uma dose que varia de 1 a 2 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em uma certa modalidade, o enalapril é administrado a uma dose que varia de 2 a 4 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em uma certa modalidade, o lisinopril é administrado a uma dose que varia de 4 a 8 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em uma certa modalidade, o benazepril é administrado a uma dose que varia de 4 a 8 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em uma certa modalidade, o fosinopril é administrado a uma dose que varia de 4 a 8 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em uma certa modalidade, o quinapril é administrado a uma dose que varia de 4 a 8 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em uma certa modalidade, o cilazapril é administrado a uma dose que varia de 1 a 2 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em uma certa modalidade, o perinpril é administrado a uma dose que varia de 1 a 2 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em uma certa modalidade, o trandolapril é administrado a uma dose que varia de 0,5 a 1 mg/m<sup>2</sup>/dia.

[0233] Em certas modalidades, um ARB é administrado a uma dose que varia de 6,25 a 150 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em certas modalidades, um ARB é administrado a uma dose de 6,25 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em certas modalidades, um ARB é administrado a uma dose de 10 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em certas modalidades, um ARB é

administrado a uma dose de 12,5 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em certas modalidades, um ARB é administrado a uma dose de 18,75 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em certas modalidades, um ARB é administrado a uma dose de 37,5 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em certas modalidades, um ARB é administrado a uma dose de 50 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em certas modalidades, um ARB é administrado a uma dose de 150 mg/m<sup>2</sup>/dia.

[0234] Em certas modalidades, a lasartana é administrada a uma dose de 12,5 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em certas modalidades, a lasartana é administrada a uma dose de 12,5 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em certas modalidades, a candesartana é administrada a uma dose de 6,25 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em certas modalidades, a irbestartana é administrada a uma dose de 37,5 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em certas modalidades, a telmisartana é administrada a uma dose de 10 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em certas modalidades, a valsartana é administrada a uma dose de 18,75 mg/m<sup>2</sup>/dia. Em certas modalidades, a espresartana é administrada a uma dose de 150 mg/m<sup>2</sup>/dia.

[0235] Em certas modalidades, um agente farmacêutico é um antagonista da aldosterona. Em certas modalidades, um antagonista da aldosterona é a espironolactona. Em certas modalidades, a espironolactona é administrada a uma dose que varia de 10 a 35 mg por dia. Em certas modalidades, a espironolactona é administrada a uma dose de 25 mg por dia.

[0236] Em certas modalidades, os agentes farmacêuticos incluem heparinoides. Em certas modalidades, um heparinoide é o polissulfato de pentosano.

[0237] Em certas modalidades, um agente farmacêutico é um agente farmacêutico que bloqueia uma ou

mais respostas a sinais fibrogênicos.

[0238] Em certas modalidades, um agente farmacêutico é uma terapia de fator de crescimento de tecido anticonjuntivo. Em certas modalidades, uma terapia anti-CTGF é um anticorpo monoclonal contra o CTGF.

[0239] Em certas modalidades, uma terapia adicional pode ser um agente farmacêutico que potencia o sistema imunológico do corpo, incluindo ciclofosfamida de dose baixa, timostimulina, vitaminas e suplementos nutricionais (p.ex., antioxidantes, incluindo vitaminas A, C, E, beta-caroteno, zinco, selênio, glutathione, coenzima Q-10 e equinácea) e vacinas, p.ex., complexo imunestimulante (ISCOM), que compreende uma formulação de vacina que combina uma apresentação multimérica de antígeno e um adjuvante.

[0240] Em certas modalidades, a terapia adicional é selecionada para tratar ou melhorar um efeito colateral de uma ou mais composições farmacêuticas da presente invenção. Tais efeitos colaterais incluem, sem limitação, reações no sítio da injeção, anormalidades no teste da função hepática, anormalidades da função renal, toxicidade hepática, toxicidade renal, anormalidades do sistema nervoso central, e miopatias. Por exemplo, níveis de aminotransferase aumentados no soro podem indicar toxicidade hepática ou anormalidade da função hepática. Por exemplo, num aumento da bilirrubina pode indicar toxicidade hepática ou anormalidade da função hepática.

[0241] Outros exemplos de agentes farmacêuticos adicionais incluem, mas não estão limitados a, imunoglobulinas, incluindo, mas não limitadas a imunoglobulina intravenosa (IVIg); analgésicos (p.ex.,

acetaminofeno); salicilatos; antibióticos; antivirais; agentes antifúngicos; modificadores adrenérgicos; hormônios (p.ex., esteroides anabólicos, andrógeno, estrógeno, calcitonina, progestina, somatostatina e hormônios da tiroide); imunomoduladores; relaxantes musculares; anti-histaminas; agentes de osteoporose (p.ex., bifosfonatos, calcitonina e estrógenos); prostaglandinas, agentes antineoplásicos; agentes psicoterapêuticos; sedativos; produtos de carvalho venenoso ou sumagre venenoso; anticorpos; e vacinas.

#### CERTOS KITS

[0242] A presente invenção também fornece *kits*. Em algumas modalidades, os *kits* compreendem um ou mais compostos da invenção que compreendem um oligonucleotídeo modificado, em que a sequência de nucleobases do oligonucleotídeo é complementar da sequência de nucleobases do miR-21. Os compostos complementares do miR-21 podem ter qualquer um dos padrões de nucleosídeos descritos na presente invenção. Em algumas modalidades, os compostos complementares do miR-21 podem estar presentes dentro de um frasco. Uma pluralidade de frascos, tal como 10, pode estar presente, por exemplo, em pacotes de dispensação. Em algumas modalidades, o frasco é fabricado de modo a ser acessível com uma seringa. O *kit* pode também conter instruções para o uso dos compostos complementares do miR-21.

[0243] Em algumas modalidades, os *kits* podem ser usados para a administração do composto complementar do miR-21 a um indivíduo. Em tais casos, para além dos compostos complementares do miR-21, o *kit* pode compreender ainda um ou mais dos seguintes artigos: seringa, cotonete, bola de

algodão, e/ou compressa de gaze. Em algumas modalidades, os compostos complementares do miR-21 podem estar presentes em uma seringa pré-carregada (tal como uma seringa de dose única com, por exemplo, uma agulha de calibre 27, 1/2 polegada, com uma proteção de agulha) ao invés de em um frasco. Uma pluralidade de seringas pré-carregadas, tal como 10, pode estar presente, por exemplo, em pacotes de dispensação. O *kit* pode também conter instruções para administração dos compostos complementares do miR-21.

#### CERTOS MODELOS EXPERIMENTAIS

[0244] Em certas modalidades, a presente invenção fornece métodos para usar e/ou testar oligonucleotídeos modificados da presente invenção em um modelo experimental. Os especialistas na técnica são capazes de selecionar e modificar os protocolos para tais modelos experimentais para avaliar um agente farmacêutico da invenção.

[0245] Geralmente, os oligonucleotídeos modificados são primeiro testados em células cultivadas. Os tipos de células adequados incluem aqueles que estão relacionados com o tipo de célula ao qual a entrega de um oligonucleotídeo modificado é desejada *in vivo*. Por exemplo, os tipos de células adequados para o estudo dos métodos descritos no presente documento incluem células primárias ou cultivadas.

[0246] Em certas modalidades, a extensão em que um oligonucleotídeo modificado interfere com a atividade do miR-21 é avaliada nas células cultivadas. Em certas modalidades, a inibição da atividade do microRNA pode ser avaliada medindo-se os níveis do microRNA. Alternativamente,

pode ser medido o nível de um transcrito regulado por microRNA previsto ou validado. Uma inibição da atividade do microRNA pode resultar no aumento do transcrito regulado pelo miR-21, e/ou da proteína codificada pelo transcrito regulado pelo miR-21. Ademais, em determinadas modalidades, podem ser medidos determinados resultados fenotípicos.

[0247] O perito na técnica tem ao seu dispôr diversos modelos animais para o estudo do miR-21 em modelos de doença humana. Por exemplo, os inibidores do miR-21 podem ser estudados num modelo experimental de Síndrome de Alport, por exemplo em ratinhos de Col4a3 nocauteado (ratinhos Col4a3<sup>-/-</sup>). A gravidade da doença no modelo de ratinhos depende da herança genética do ratinho portador da mutação Col4a3. Por exemplo, o surgimento e progressão da doença são geralmente mais rápidos nos antecedentes 129X1/SvJ relativamente a C57BL/6J. Consequentemente, a herança genética dos ratinhos Col4a3<sup>-/-</sup> pode ser selecionada de modo a variar o surgimento e a progressão da doença. Modelos adicionais incluem modelos caninos da Síndrome de Alport ligada ao X, autossômica recessiva ou autossômica dominante. Ver, por exemplo, Kashtan, Nephrol. Dial. Transplant, 2002, 17: 1359-1361.

#### CERTOS ENSAIOS QUANTITATIVOS

[0248] Os efeitos da inibição antissentido do miR-21 após a administração de oligonucleotídeos modificados podem ser avaliados por uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Em determinadas modalidades, esses métodos devem ser usados para quantificar os níveis de microRNA nas células ou tecidos *in vitro* ou *in vivo*. Em certas modalidades, as alterações nos níveis de microRNA são medidas por análise de

microensaio. Em certas modalidades, as alterações nos níveis de microRNA são medidas por um dos diversos ensaios de PCR comercialmente disponíveis, tal como o Ensaio de MicroRNA TaqMan® (Applied Biosystems). Em certas modalidades, a inibição antissentido do miR-21 é avaliada medindo o nível de mRNA e/ou de proteína de um alvo do miR-21. A inibição antissentido do miR-21 resulta geralmente no aumento do nível de mRNA e/ou da proteína de um alvo do microRNA.

#### ENSAIO DE ACOPLAMENTO DE ALVO

[0249] A modulação da atividade do microRNA com uma mimetização de anti-miR ou microRNA pode ser avaliada medindo-se o acoplamento de alvo. Em certas modalidades, o acoplamento de alvo é medido pelo perfilamento dos microarranjos de mRNA. As sequências dos mRNA que são moduladas (aumentadas ou diminuídas) pela mimetização de anti-miR ou microRNA são pesquisadas quanto a sequências iniciais de microRNA, para comparar a modulação dos mRNA que são alvos do microRNA com a modulação dos mRNA que não são alvos do microRNA. Dessa maneira, pode ser avaliada a interação do anti-miR com o miR-21 ou da mimetização do miR-21 com seus alvos. No caso de um anti-miR, os mRNA cujos níveis de expressão são aumentados, são triados quanto às sequências de mRNA que compreendem uma compatibilidade inicial com o microRNA do qual o anti-miR é complementar.

#### EXEMPLOS

[0250] Os seguintes exemplos são apresentados a fim de ilustrar mais completamente algumas modalidades da invenção. Os mesmos não devem, no entanto, ser interpretados como limitativos do amplo escopo da invenção.

[0251] Os peritos na técnica adotarão

prontamente os princípios subjacentes dessa descoberta para projetar vários compostos sem se afastarem do espírito da invenção atual.

[0252] Exemplo 1 Anti-miR-21 em um modelo da Síndrome de Alport

[0253] Ratinhos *Col4a3<sup>-/-</sup>* com os antecedentes genéticos 129sv desenvolvem espontaneamente doença renal grave similar à Síndrome de Alport humana. Como tal, os ratinhos *Col4a3<sup>-/-</sup>* são usados como modelo experimental da Síndrome de Alport.

[0254] Oligonucleotídeos modificados complementares do miR-21 (compostos anti-miR-21) foram testados no modelo *Col4a3<sup>-/-</sup>* da Síndrome de Alport. Foram usados ratinhos do tipo selvagem como ratinhos de controle.

[0255] A estrutura do composto anti-miR-21 é 5'-A<sub>E</sub>C<sub>S</sub>ATC<sub>S</sub>AGTC<sub>S</sub>TGAU<sub>S</sub>AAGC<sub>S</sub>TA<sub>E</sub>-3' (SEQ ID NO: 3), em que os nucleosídeos não seguidos de um subscrito indicam β-D-desoxirribonucleosídeos; os nucleosídeos seguidos de um subscrito "E" indicam nucleosídeos 2'-MOE; os nucleosídeos seguidos de um subscrito "S" indicam nucleosídeos S-cEt. Cada ligação internucleosídica é uma ligação internucleosídica fosforotioato.

[0256] Às 3 semanas de idade, os ratinhos foram genotipados para identificação de ratinhos *Col4a3<sup>-/-</sup>*. Das 3 semanas de idade às 9 semanas de idade, ninhadas de ratinhos pareados por sexo foram tratadas com anti-miR-21 ou PBS. O anti-miR-21 foi administrado subcutaneamente a uma dose de 25 mg/kg, duas vezes por semana. Os grupos de tratamento foram: (1) ratinhos do tipo selvagem, administração de PBS, n = 8; (2) ratinhos *Col4a3<sup>-/-</sup>*, administração de PBS, n = 12; (3)

ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup>, administração de anti-miR-21, n = 12. Foram usadas ninhadas do tipo selvagem de ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup> como ratinhos de controle do tipo selvagem. Foi recolhida semanalmente uma amostra de urina noturna (de aproximadamente 16 horas). O plasma e os rins foram recolhidos no final da semana 9. Foram analisadas amostras de fluido e de tecido para se determinar as alterações na função renal, dano renal, esclerose glomerular e fibrose intersticial.

[0257] Os pontos finais no sangue ou na urina incluíram a medição do nitrogênio ureico no sangue (BUN), albuminúria, razão albumina/creatinina, taxa de filtração glomerular. A análise histológica incluiu a avaliação da esclerose glomerular, fibrose intersticial, lesão nos túbulos, infiltração de macrófagos, e presença de miofibroblastos.

[0258] O nitrogênio ureico no sangue (BUN) foi medido à semana 9. A significância estatística foi calculada por meio do teste de Mann Whitney. Tal como se mostra na Figura 1A, foi observada no final do estudo uma redução estatisticamente significativa no BUN em animais tratados com anti-miR-21, relativamente a animais de controle tratados com PBS. A redução do BUN foi observada globalmente (Figura 1A), bem como em ratinhos-macho apenas (aproximadamente 90 mg/dL em comparação com aproximadamente 25 mg/dL em ratinhos-macho de controle) e ratinhos-fêmea apenas (aproximadamente 70 mg/dL em comparação com aproximadamente 25 mg/dL em ratinhos-fêmea de controle) não apresentados). O BUN em ratinhos *Col4a3*<sup>+/+</sup> foi aproximadamente de 12,5 mg/dL (dentro de limites normais; não apresentado). O BUN é um marcador sanguíneo da função renal. Um BUN mais elevado correlaciona-

se com uma função renal mais fraca. Uma redução no BUN é um indicador de lesão e dano renais reduzidos, e de melhoria da função.

[0259] A albuminúria foi avaliada por medição da albumina em amostras de urina colhidas ao longo de 16 horas com a frequência de uma vez por semana por ELISA, e normalização para a excreção de creatinina urinária. Todas as análises foram efetuadas ao mesmo tempo no final do estudo. Tal como se mostra na Figura 1B, os ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup> desenvolvem albuminúria grave. No entanto, os ratinhos tratados com anti-miR-21 desenvolveram muito menos albuminúria, tal como detetado por uma redução na razão albumina para creatinina urinárias. Essa redução foi observada pela semana 7, e persistiu até à semana 9. As ninhadas do tipo selvagem de ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup> não apresentaram qualquer albuminúria, tal como esperado. A albuminúria é uma medida sensível de dano glomerular e tubular. Uma redução na razão albumina para creatinina indica uma redução na doença glomerular e/ou tubular.

[0260] A Síndrome de Alport é também caracterizada pelo desenvolvimento progressivo da glomerulosclerose e de fibrose renal intersticial significativa que ocorre à medida que ocorre vazamento glomerular inapropriado. Consequentemente, a glomerulosclerose foi avaliada pontuando cegamente os glomérulos quanto a lesões escleróticas (perda de anel capilar+fibrose ou hialinose). Foram pontuados sequencialmente trinta glomérulos de cada ratinho por um observador cego. O escore variou de 0-4, onde 0 = normal; 1 = <25% dos glomérulos afetados por esclerose; 2 = 25-50% dos

glomérulos afetados por esclerose; 3 = 50-75% dos glomérulos afetados por esclerose; 4 = 75-100% dos glomérulos afetados por esclerose. A proporção de glomérulos sem qualquer doença foi muito superior em ratinhos tratados com anti-miR-21, e a proporção de glomérulos com glomérulos moderada ou gravemente afetados (escore 2-4) foi significativamente superior nos ratinhos tratados com PBS (Figura 2). Os glomérulos foram também pontuados em ninhadas do tipo selvagem (WT) de ratinhos *Col43a*<sup>-/-</sup>. A fibrose intersticial foi medida morfometricamente em seções sagitais completas coradas com vermelho de Pricosírius de animais *Col4a3*<sup>-/-</sup> tratados com PBS e anti-miR-21. Tal como se mostra na Figura 3A, foi observada uma redução estatisticamente significativa na fibrose intersticial nos ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup> tratados com anti-miR-21. Para além disso, PCR quantitativa para os transcritos para a principal proteína de matriz Colágeno I $\alpha$ (1) (*Colla1*) patológico mostrou que o tecido renal de ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup> tratados com anti-miR-21 apresentou muito menos produção deste colágeno patológico (Figura 3B).

[0261] A lesão do tecido renal foi avaliada em seções de tecidos mergulhadas em parafina e fixadas em paraformaldeído (4%), coradas por meio de reação do ácido periódico de Schiff (PAS). Inicialmente, as seções de rim foram classificadas quanto à lesão global com base na lesão e inflamação tubulares e glomerulares. Os danos foram avaliados com base em uma variedade de fatores incluindo a dilatação dos túbulos, perda do rebordo em escova, infiltração celular, inflamação glomerular, edema intersticial e necrose celular. As seções do rim foram classificadas de modo cego quanto à lesão global e foi-lhes atribuída um escore de classificação

da lesão renal. As seções do rim de ratinhos *Col4a3*  $-/-$  mostraram um escore da classificação da lesão renal que é indicativo de uma menor lesão renal (Figura 4A). Para analisar esses dados mais em detalhe, os glomérulos foram avaliados por um observador cego quanto à proporção que tinha crescentes glomerulares. O crescente é uma proliferação de células na cápsula de Bowman, e é definido por  $\geq 2$  camadas de células dentro do espaço de Bowman. O crescente é um marcador bem estabelecido de lesão glomerular. Em ratinhos *Col4a3*  $-/-$  que receberam anti-miR-21, a proporção de glomérulos com crescentes foi aproximadamente de 44%, enquanto que em ratinhos que receberam o tratamento de controle com PBS, a proporção de glomérulos com crescentes foi aproximadamente de 19% (Figura 4B). Em ninhadas *Col4a3*  $+/+$ , a proporção de glomérulos com crescentes foi de menos de 5% (não apresentada). Os túbulos dos néfrons dos rins são também um sítio para danos. Os danos nos túbulos foram avaliados sobrepondo uma grelha sobre imagens sequenciais que cobrem toda a seção sagital de cada rim. De uma forma cega, o dano dos túbulos foi avaliado em cada quadrado da grelha. O dano tubular foi avaliado com base na presença de dilatação/achatamento dos túbulos, perda dos rebordos em escova, infiltração celular, e necrose celular. A presença destas características resulta em um escore positivo para esse quadrado na grelha. É aplicado um escore global a cada imagem, que é a % de quadrados que possui danos nos túbulos. É calculada a média para todas as imagens desse rim. O escore médio para cada rim é então submetido a análise estatística. Tal como se mostra, o escore da lesão tubular foi significativamente inferior nos ratinhos *Col4a3*  $-/-$  tratados

com anti-miR-21, em relação aos *Col4a3*<sup>-/-</sup> que receberam PBS (Figura 4C). O escore dos danos tubulares em ninhadas *Col4a3*<sup>+/+</sup> foi de menos de 10% (não apresentado).

[0262] Foi efetuada uma análise histológica adicional de amostras de rim para avaliar a infiltração de macrófagos, estabilidade endotelial, e a deposição de miofibroblastos. Tal como se julga por coloração de F4/80, a infiltração de macrófagos foi reduzida em ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup> tratados com anti-miR-21 em comparação com ratinhos de controle *Col4a3*<sup>-/-</sup> tratados com PBS (Figura 5A). A coloração imunocitoquímica para CD31 demonstrou uma melhoria na estabilidade endotelial em ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup> tratados com anti-miR-21 em comparação com ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup> de controle tratados com PBS (não apresentada). A detecção de alfa-SMA revelou uma redução na deposição de miofibroblastos em ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup> tratados com anti-miR-21 em comparação com ratinhos de controle *Col4a3*<sup>-/-</sup> tratados com PBS (Figura 5B). Em ratinhos *Col4a3*<sup>+/+</sup>, a coloração de alfa-SMA foi de aproximadamente 5% (não apresentada).

[0263] As espécies reativas de oxigênio (ROS) são um subproduto do metabolismo celular normal. Durante o estresse celular, o excesso de ROS pode causar a peroxidação lipídica das membranas celulares e das organelas, resultando em rompimento da integridade estrutural e da capacidade para transporte de células e produção de energia. Nos rins, as ROS produzidos durante o estresse celular podem causar lesão renal. Para avaliar se a geração de ROS foi reduzida a seguir à inibição do miR-21 em ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup>, foram medidos os níveis de peróxido de hidrogênio urinário em ratinhos tratados com anti-miR-21 e PBS. Os níveis de

peróxido de hidrogênio urinário foram significativamente reduzidos em ratinhos que receberam anti-miR-21 (Figure 6A). Em ratinhos *Col4a3+/+*, os níveis de peróxido de hidrogênio urinário foram inferiores a 5  $\mu$ M (não apresentados). Para além disso, a coloração imunocitoquímica do tecido renal com dihidroetídio (DHE), que é uma medida das ROS, demonstrou uma redução nos ROS no tecido renal de ratinhos *Col4a3-/-* tratados com anti-miR-21 em comparação com ratinhos de controle tratados com PBS (Figura 6B). Em ratinhos *Col4a3+/+*, foi observada menos de 10% de coloração com DHE (não apresentada). Esses dados demonstram uma redução das ROS tanto na urina como no tecido renal em ratinhos *Col4a3-/-* tratados com anti-miR-21. Consequentemente, um mecanismo pelo qual o anti-miR-21 pode reduzir a lesão renal pode incluir uma redução na geração de espécies reativas de oxigênio.

[0264] A imunotransferência de proteínas nos rins de ratinhos *Col4a3-/-* tratados com anti-miR-21 revelou um aumento na quantidade de proteína MPV17L nos rins em relação a ratinhos *Col4a3-/-*. A MPV17L é uma proteína da membrana interna mitocondrial que está implicada no metabolismo das espécies reativas de oxigênio, e que protege contra o estresse oxidativo. Consequentemente, a reduzida geração de ROS após o tratamento com anti-miR-21 pode ocorrer pelo menos em parte devido ao aumento dos níveis de MPV17L. Para explorar mais os efeitos mecanísticos do anti-miR-21, a proteína PPAR-alfa foi medida por imunotransferência dos rins de ratinhos *Col4a3-/-* tratados com PBS ou que receberam tratamento anti-miR-21. O tratamento com anti-miR-21 aumentou a proteína PPAR-alfa, sugerindo uma estimulação das vias metabólicas.

[0265] Os podócitos são células epiteliais altamente especializadas que são um componente essencial da barreira de filtração glomerular. A perda de podócitos pode conduzir a proteinúria, e em alguns estados patológicos, a glomerulosclerose. Para avaliar se o número de podócitos foi afetado por inibição do miR-21 em ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup>, foi medido o número de podócitos em ratinhos tratados com anti-miR-21 e PBS. O número de podócitos aumentou significativamente em ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup> que receberam anti-miR-21, em relação a ratinhos tratados com PBS, e foi comparável ao número de podócitos observado em ninhadas do tipo selvagem de ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup> (Figura 7). Consequentemente, um mecanismo pelo qual o anti-miR-21 pode reduzir a lesão renal em um modelo de Síndrome de Alport é prevenindo ou reduzindo a perda de podócitos.

[0266] Foi conduzido um estudo similar usando os seguintes compostos anti-miR-21:

[0267] Composto anti-miR-21 #1 (acima): 5'-A<sub>E</sub>C<sub>S</sub>ATC<sub>S</sub>AGTC<sub>S</sub>TGAU<sub>S</sub>AAGC<sub>S</sub>TA<sub>E</sub>-3' (SEQ ID NO:3)

[0268] Composto anti-miR-21 #2: 5'-A<sub>E</sub>C<sub>S</sub>ATC<sub>S</sub>A<sub>S</sub>GTC<sub>S</sub>U<sub>S</sub>GAU<sub>S</sub>A<sub>S</sub>AGC<sub>S</sub>U<sub>S</sub>A<sub>E</sub>-3' (SEQ ID NO: 3);

[0269] Composto anti-miR-21 #3: 5'-<sup>Me</sup>C<sub>E</sub>A<sub>S</sub>A<sub>S</sub>T<sub>E</sub>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub>A<sub>E</sub>A<sub>E</sub>U<sub>S</sub>A<sub>S</sub>A<sub>E</sub>G<sub>E</sub>C<sub>S</sub>T<sub>E</sub>A<sub>S</sub>-3' (SEQ ID NO: 4); e

[0270] Composto anti-miR-21 #4: 5'-A<sub>E</sub>C<sub>S</sub>A<sub>E</sub>T<sub>E</sub>C<sub>S</sub>A<sub>E</sub>G<sub>E</sub>T<sub>E</sub>C<sub>S</sub>TGAU<sub>S</sub>AAGC<sub>S</sub>U<sub>S</sub>A<sub>S</sub>-3' (SEQ ID NO: 3); em que os nucleosídeos não seguidos de um subscrito indicam β-D-desoxirribonucleosídeos; os nucleosídeos seguidos de um subscrito "E" indicam nucleosídeos 2'-MOE; os nucleosídeos seguidos de um subscrito "S" indicam nucleosídeos S-cEt; e um superescrito "Me" indica um grupo 5-metila na base do

nucleosídeo. Cada ligação internucleosídica é uma ligação internucleosídica fosforotioato.

[0271] Cada composto foi administrado a ratinhos Col4a3<sup>-/-</sup> de três semanas de idade a uma dose de 25 mg/kg, duas vezes por semana, durante nove semanas. Os grupos de controle incluíram ratinhos Col4a3<sup>-/-</sup> tratados com PBS, e ninhadas do tipo selvagem de ratinhos Col4a3<sup>-/-</sup>. Cada grupo de tratamento continha 10 a 12 ratinhos. Para os compostos #1, 2, e 4, os pontos finais foram avaliados tal como descrito acima e incluíram o BUN, razão albumina para creatinina urinárias, lesão renal (coloração com PAS), glomerulosclerose, e proporção de glomérulos com crescentes. Para o composto #3, os pontos finais incluíram BUN, razão albumina para creatinina urinárias, e expressão do gene do colágeno (como medida da fibrose), avaliados como descrito acima.

[0272] Consistente com os resultados descritos acima, o composto anti-miR-21 #1 melhorou todos os pontos finais avaliados. A eficácia de ambos os compostos anti-miR-21 #2 foi semelhante à do composto #1, com melhorias observadas no BUN, razão albumina para creatinina urinárias, lesão renal, extensão de glomerulosclerose, e percentagem de glomérulos com crescentes. A eficácia do composto #3 foi semelhante à do composto #1, com melhorias no BUN, razão albumina para creatinina urinárias, e expressão de Colla1. O composto anti-miR-21 #4, embora menos eficaz que os outros compostos testados, resultou ainda em melhorias no BUN, lesão renal, extensão de glomerulosclerose, e percentagem de glomérulos com crescentes.

[0273] Considerados em conjunto, esses dados

ilustram que em um modelo de Síndrome de Alport, o tratamento com anti-miR-21 atenuou a perda da função renal e o desenvolvimento de albuminúria. A glomerulosclerose e a fibrose intersticial foram marcadamente atenuadas e os túbulos proximais preservados. Uma vez que o anti-miR-21 previne a perda progressiva da função renal nos ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup>, e atenua tanto a doença glomerular como túbulo-intersticial, o anti-miR-21 é um agente terapêutico para a Síndrome de Alport humana.

[0274] Exemplo 2: Elevação do miR-21 em um modelo da Síndrome de Alport

[0275] Para avaliar a desregulação do miR-21 em um modelo experimental da Síndrome de Alport, foram medidos os níveis de miR-21 no tecido renal recolhido de ratinhos. Isolou-se RNA de todo o rim e mediu-se o miR-21 por PCR quantitativa. Em ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup>, os níveis de miR-21 foram elevados aproximadamente três vezes em relação aos níveis do miR-21 em ratinhos do tipo selvagem.

[0276] Consequentemente, um sujeito recebendo tratamento para a Síndrome de Alport pode ser identificado como tendo miR-21 elevado em material de biópsia renal, urina, ou sangue, antes da administração do tratamento.

[0277] Exemplo 3: Estudos de sobrevivência em um modelo de Síndrome de Alport

[0278] Os ratinhos do tipo selvagem geralmente vivem 2 a 3 anos (ou 730 a 1095 dias). Em ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup> com um antecedente 129X1/SvJ, pode ocorrer insuficiência renal logo aos dois meses de idade. Em ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup> com um antecedente C57BL/6J, pode ocorrer insuficiência renal em fase terminal logo aos 6 meses de idade. Independentemente do

antecedente, o período de vida de ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup> é significativamente mais curto do que o de ratinhos do tipo selvagem. Como tal, os ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup> com qualquer antecedente genético podem servir como modelo para a insuficiência renal em fase terminal na Síndrome de Alport, e podem ser usados para avaliar os efeitos de agentes terapêuticos candidatos na esperança de vida.

[0279] Os ratinhos são genotipados para se identificarem os ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup>. O anti-miR-21 é administrado subcutaneamente a uma dose que varia de 10 a 25 mg/kg, uma ou duas vezes por semana até um máximo de um ano. O PBS pode ser administrado como tratamento de controle. Amostras de urina noturna (de aproximadamente 16 horas) são recolhidas segundo um calendário semanal ou mensal ao longo do estudo. É registada a idade de cada ratinho quando morre. Recolhem-se o plasma e os rins quando morrem ou no final do estudo. Analisam-se amostras de fluido e de tecido para se determinar as modificações na função renal, esclerose glomerular, e fibrose.

[0280] Analisam-se amostras de fluido e de tecido para se determinar as modificações na função renal, dano renal, esclerose glomerular e fibrose intersticial. Os pontos finais no sangue ou na urina incluem a medição do nitrogênio ureico no sangue (BUN), albuminúria, razão albumina/creatinina, taxa de filtração glomerular. A análise histológica incluiu a avaliação da esclerose glomerular, fibrose intersticial, lesão nos túbulos, infiltração de macrófagos, e presença de miofibroblastos.

[0281] É observado um atraso no surgimento de insuficiência renal em fase terminal e um aumento da

esperança de vida em ratinhos tratados com anti-miR-21, relativamente a ratinhos de controle tratados com PBS, sugerindo que o anti-miR-21 é um agente terapêutico que pode aumentar a esperança de vida de sujeitos com Síndrome de Alport.

O ANTI-MIR-21 AUMENTA A SOBREVIVÊNCIA EM UM MODELO DE ESTUDO DE DOSE ÚNICA DE SÍNDROME DE ALPORT

[0282] Para avaliar os efeitos do anti-miR-21 na sobrevivência em um modelo experimental de Síndrome de Alport, foi administrado composto anti-miR-21 a ratinhos Col4a3-/-.

[0283] A estrutura do composto anti-miR-21 é 5'-AECSATCSAGTCSTGAUSAAGCSTAE-3' (SEQ ID NO: 3), em que os nucleosídeos não seguidos de um subscrito indicam  $\beta$ -D-desoxirribonucleosídeos; os nucleosídeos seguidos de um subscrito "E" indicam nucleosídeos 2'-MOE; os nucleosídeos seguidos de um subscrito "S" indicam nucleosídeos S-cEt. Cada ligação internucleosídica é uma ligação internucleosídica fosforotioato.

[0284] Ratinhos Col4a3+/1 (heterozigóticos) com um antecedente 129X1/SvJ foram cruzados para gerar ratinhos Col4a3-/-. Às 3 semanas de idade, os ratinhos foram genotipados para identificação de ratinhos Col4a3-/-. Os grupos de tratamento foram: (1) ratinhos Col4a3+/+ ( ninhadas do tipo selvagem), administração de PBS, duas vezes por semana, n = 12; (2) ratinhos Col4a3/-, administração de PBS, duas vezes por semana, n = 12; (3) ratinhos Col4a3/-, 25 mg/kg de anti-miR-21, administração subcutânea, duas vezes por semana, n = 12. Os tratamentos foram administrados duas vezes por semana, desde a semana 3 até à semana 16. Os pesos

dos animais foram determinados semanalmente, e registou-se o tempo de vida.

[0285] Tal como esperado, os ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup> sofreram uma perda de peso começando cerca das 9 semanas de idade, e a morte ocorreu entre as 9 e as 11 semanas de idade. Tal como se mostra na Figura 8A, o anti-miR-21 aumentou o pico do peso corporal e retardou significativamente a perda de peso ( $p < 0,01$ ). Tal como se mostra na Figura 8B, o anti-miR-21 aumentou significativamente o tempo de vida ( $p < 0,001$ ). Assim, o tratamento com anti-miR-21 não retardou apenas a perda de peso, mas melhorou de forma importante a sobrevivência de rainhos *Col4a3*<sup>-/-</sup>.

O ANTI-MIR-21 AUMENTA A SOBREVIVÊNCIA EM UM MODELO DE ESTUDO DA RESPOSTA À DOSE NA SÍNDROME DE ALPORT

[0286] Para avaliar os efeitos da resposta à dose do anti-miR-21 na sobrevivência em um modelo experimental de Síndrome de Alport, foram administradas várias doses de composto anti-miR-21 a ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup>.

[0287] A estrutura do composto anti-miR-21 é 5'-A<sub>E</sub>C<sub>S</sub>ATC<sub>S</sub>AGTC<sub>S</sub>TGAU<sub>S</sub>AAGC<sub>S</sub>TA<sub>E</sub>-3' (SEQ ID NO: 3), em que os nucleosídeos não seguidos de um subscrito indicam β-D-desoxirribonucleosídeos; os nucleosídeos seguidos de um subscrito "E" indicam nucleosídeos 2'-MOE; os nucleosídeos seguidos de um subscrito "S" indicam nucleosídeos S-cEt. Cada ligação internucleosídica é uma ligação internucleosídica fosforotioato.

[0288] Às 3 semanas de idade, os ratinhos foram genotipados para identificação de ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup>. Os grupos de tratamento foram:

(1) ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup>, administração de PBS uma

vez por semana, n = 13;

(2) ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup>, administração de 12,5 mg/kg de anti-miR-21, uma vez por semana, n = 12;

(3) ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup>, administração de 25 mg/kg de anti-miR-21, uma vez por semana, n = 13;

(4) ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup>, administração de 50 mg/kg de anti-miR-21, uma vez por semana, n = 12;

(5) ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup>, administração de 25 mg/kg de anti-miR-21, duas vezes por semana, n = 12;

[0289] Os tratamentos foram administrados começando no dia 24. Os pesos dos animais foram determinados semanalmente, e registou-se o tempo de vida. Na semana 7, foi recolhido sangue para determinação do BUN.

[0290] Tal como se mostra na Figura 9A, foi observada uma redução no BUN em animais tratados com anti-miR-21, relativamente a animais de controle tratados com PBS. Embora se tenha observado uma redução no BUN, a mesma não foi fortemente sensível à dose, talvez devido ao fato da doença ser mais grave nos ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup> usados para esta experiência (os ratinhos foram obtidos de um fornecedor diferente do dos ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup> descritos nos exemplos anteriores). A redução observada no BUN é um indicador da redução da lesão e dano renais, e de melhoria da função.

[0291] Tal como se mostra na Figura 9B, o tratamento com anti-miR-21 aumentou o tempo de vida dos ratinhos *Col4a3*<sup>-/-</sup> de forma dependente da dose. O aumento do tempo de vida foi observado tanto para os tratamentos duas vezes por semana como uma vez por semana. A média da sobrevivência foi a seguinte: PBS, 62 dias; 12,5 mg/kg de anti-miR-21 uma vez por semana (QW), 72,5 dias; 25 mg/kg de

anti-miR-21 uma vez por semana (QW), 77 dias; 50 mg/kg de anti-miR-21 uma vez por semana (QW), 89 dias; 25 mg/kg de anti-miR-21 duas vezes por semana (BIW), 82,5 dias.

[0292] Foi observado um atraso no surgimento de disfunção renal e um aumento da esperança de vida em ratinhos tratados com anti-miR-21, relativamente a ratinhos de controle tratados com PBS, sugerindo que o anti-miR-21 é um agente terapêutico que pode aumentar a esperança de vida de sujeitos com Síndrome de Alport.

[0293] Exemplo 4: Distribuição de Anti-miR nos rins de ratinhos Col4a3-/-

[0294] Os oligonucleotídeos, incluindo compostos anti-miR, são conhecidos por se distribuírem por vários tipos de células nos rins. Tal como relatado por Chau *et al.*, *Sci Transl Med.*, 2012, 121ra18, após a administração de um anti-miR marcado com Cy3 quer a ratinhos normais, quer a ratinhos sujeitos a lesão renal (obstrução ureteral unilateral, um modelo de fibrose intersticial), a maior intensidade de fluorescência nos rins foi no epitélio tubular proximal. O endotélio, pericitos, miofibroblastos, e macrófagos também continham, todos eles, quantidades detetáveis de anti-miR marcado com Cy3. Contudo, os glomérulos, em particular os podócitos, não pareceram absorver quantidades significativas de anti-miR, consistente com a conhecida distribuição de oligonucleotídeos quimicamente modificados (Masarjian *et al.*, *Oligonucleotides*, 2004, 14, 299-310).

[0295] Para investigar a distribuição de anti-miR em um modelo de ratinhos com Síndrome de Alport, foi administrado composto anti-miR marcado com Cy3 a dois grupos diferentes de ratinhos Col4a3-/-, um às 6 semanas de idade (n

= 3) e um às 8 semanas de idade (n = 4, e a um grupo de ratinhos do tipo selvagem às 8 semanas de idade (n = 3). Dois dias depois da administração do composto anti-miR, os animais foram sacrificados e os rins foram recolhidos e processados para análise histológica.

[0296] As seções de tecido renal foram comarcadas com anticorpos específicos de vários marcadores celulares diferentes para se identificar a absorção de anti-miR em tipos de células particulares. A coloração foi efetuada para a alfa-SMA (um marcador de miofibroblastos), PDGFR-beta (um marcador de pericitos/miofibroblastos), CD31 (um marcador de células endoteliais), F4/80 (um marcador de macrófagos), e GP38 (um marcador de podócitos). Tal como esperado, o composto anti-miR foi absorvido pelo epitélio tubular proximal, pericitos, miofibroblastos, e macrófagos. Em contraste com observações anteriores em ratinhos normais e ratinhos com fibrose intersticial, nos ratinhos Col4a3-/-, o anti-miR foi absorvido pelos glomérulos, incluindo podócitos.

[0297] Tal como descrito no presente documento, a eficácia observada após a administração de anti-miR-21 em um modelo experimental de Síndrome de Alport é acompanhada de melhorias não só da fibrose intersticial em torno dos túbulos, mas também da fibrose nos glomérulos (conhecida como glomerulosclerose). Estes dados sugerem que essas melhorias podem estar diretamente relacionadas com efeitos do anti-miR-21 nos glomérulos, para além de, ou em vez de, *feedback* de uma estrutura e função tubulares melhoradas.

REIVINDICAÇÕES

1. USO DE UM OLIGONUCLEOTÍDEO MODIFICADO DA ESTRUTURA 5'-A<sub>E</sub>C<sub>S</sub>ATC<sub>S</sub>AGTC<sub>S</sub>TGAU<sub>S</sub>AAGC<sub>S</sub>TA<sub>E</sub>-3' (SEQ ID NO: 3) NA FABRICAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA USO EM UM MÉTODO PARA TRATAR A SÍNDROME DE ALPORT, caracterizado por compreender a administração a um sujeito que tem ou se suspeita ter Síndrome de Alport, do oligonucleotídeo modificado da estrutura 5'-A<sub>E</sub>C<sub>S</sub>ATC<sub>S</sub>AGTC<sub>S</sub>TGAU<sub>S</sub>AAGC<sub>S</sub>TA<sub>E</sub>-3' (SEQ ID NO: 3), em que os nucleosídeos não seguidos de um subscrito indicam β-D-desoxirribonucleosídeos; os nucleosídeos seguidos de um subscrito "E" indicam nucleosídeos 2'-O-metoxietila (2'-MOE); os nucleosídeos seguidos de um subscrito "S" indicam nucleosídeos S-cEt, e cada ligação internucleosídica é uma ligação internucleosídica fosforotioato.

2. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo sujeito ter sido diagnosticado como tendo Síndrome de Alport antes da administração do oligonucleotídeo modificado.

3. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por, antes da administração do oligonucleotídeo modificado, ter sido determinado que o sujeito tinha um nível aumentado de miR-21 nos rins, urina ou no sangue.

4. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pela administração:

- a. melhorar a função renal;
- b. retardar o surgimento de doença renal em fase terminal;
- c. retardar a necessidade de diálise;
- d. retardar a necessidade de transplante renal;

e/ou

e. melhorar a expectativa de vida.

5. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pela administração:

a. reduzir a hematúria;

b. retardar o aparecimento de hematúria;

c. reduzir a proteinúria;

d. retardar o aparecimento de proteinúria;

e. reduzir a fibrose renal;

f. abrandar a progressão adicional da fibrose;

e/ou

g. parar a progressão adicional da fibrose.

6. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo sujeito ter uma mutação selecionada entre uma mutação no gene que codifica a cadeia alfa 3 do colágeno do tipo IV, uma mutação no gene que codifica a cadeia alfa 4 do colágeno do tipo IV, ou uma mutação no gene que codifica a cadeia alfa 5 do colágeno do tipo IV.

7. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo sujeito ser do sexo masculino.

8. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo sujeito ser do sexo feminino.

9. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo sujeito ser identificado como tendo hematúria, e/ou proteinúria.

10. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo sujeito ter função renal reduzida.

11. USO de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo sujeito ter necessidade de função renal melhorada.

12. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo método compreender:

a. medição do nitrogênio ureico do sangue no sangue do sujeito;

b. medição da creatinina no sangue do sujeito;

c. medição da depuração da creatinina no sujeito;

d. medição da proteinúria no sujeito;

e. medição da razão albumina:creatinina no sujeito;

f. medição da taxa de filtração glomerular no sujeito;

g. medição da cistatina C no sujeito;

h. medição da proteína  $\beta$ -trace (BTP) no sangue do sujeito;

i. medição da 2-microglobulina no sangue do sujeito;

j. medição da proteína N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) na urina do sujeito;

k. medição da proteína lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL) na urina do sujeito;

l. medição da proteína molécula 1 de lesão renal (KIM-1) na urina do sujeito;

m. medição da proteína interleucina-18 (IL-18) na urina do sujeito;

n. medição dos níveis de proteína quimioatratadora de monócitos (MCP1) na urina do sujeito;

o. medição dos níveis de fator de crescimento

tecidual conjuntivo (CTGF) na urina do sujeito;

p. medição de fragmentos de colágeno IV na urina do sujeito;

q. medição de fragmentos de colágeno III na urina do sujeito; e/ou

r. medição dos níveis de proteína nos podócitos na urina do sujeito, em que a proteína nos podócitos é selecionada entre a nefrina e a podocina.

13. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pela administração melhorar um ou mais marcadores da função renal no sujeito, selecionados entre:

a. nitrogênio ureico do sangue reduzido no sangue do sujeito;

b. creatinina reduzida no sangue do sujeito;

c. depuração da creatinina melhorada no sujeito;

d. proteinúria reduzida no sujeito;

e. razão albumina:creatinina reduzida no sujeito;

f. taxa de filtração glomerular melhorada no sujeito;

g. cistatina C reduzida no sangue do sujeito;

h. proteína  $\beta$ -trace (BTP) reduzida no sangue do sujeito;

i. 2-microglobulina (B2M) reduzida no sangue do sujeito;

j. proteína NAG reduzida na urina do sujeito;

k. proteína NGAL reduzida na urina do sujeito;

l. proteína KIM-1 reduzida na urina do sujeito;

m. proteína IL-18 reduzida na urina do sujeito;

n. níveis de proteína quimioatratadora de monócitos

(MCP1) reduzidos na urina do sujeito;

o. níveis de fator de crescimento tecidual conjuntivo (CTGF) reduzidos na urina do sujeito;

p. fragmentos de colágeno IV reduzidos na urina do sujeito;

q. fragmentos de colágeno III reduzidos na urina do sujeito; e/ou

r. níveis de proteína nos podócitos reduzidos na urina do sujeito, em que a proteína nos podócitos é selecionada entre a nefrina e a podocina.

14. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5, 9, 12, ou 13, caracterizado pela proteinúria ser albuminúria.

15. USO, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pela albuminúria ser albuminúria normal elevada, microalbuminúria, ou macroalbuminúria.

16. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pela Síndrome de Alport ser a forma ligada ao X da Síndrome de Alport.

17. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pela Síndrome de Alport ser a forma autossômica da Síndrome de Alport.

18. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo método compreender a administração de pelo menos uma terapia adicional selecionada entre um inibidor da enzima conversora da angiotensina II (ACE), um bloqueador do receptor da angiotensina II (ARB), um agente anti-hipertensor, um análogo da vitamina D, um ligante de fosfato oral, diálise, e transplante de rim.

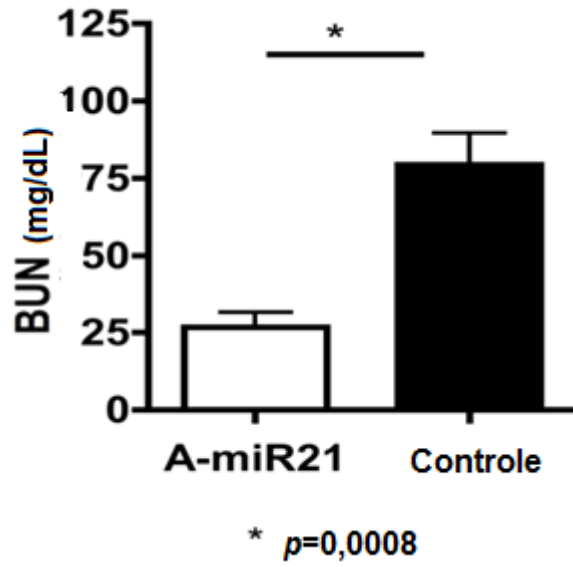
19. USO, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelos inibidores da enzima de conversão da angiotensina II (ACE) serem selecionados entre o captopril, enalapril, lisinopril, benazepril, quinapril, fosinopril, e o ramipril.

20. USO, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelos bloqueadores do receptor da angiotensina II (ARB) serem selecionados entre a candesartana, irbesartana, olmesartana, losartana, valsartana, telmisartana, e eprosartana.

21. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado pelo medicamento compreender uma dose de 110 mg do oligonucleotídeo modificado.

Figura 1.

A.



B.

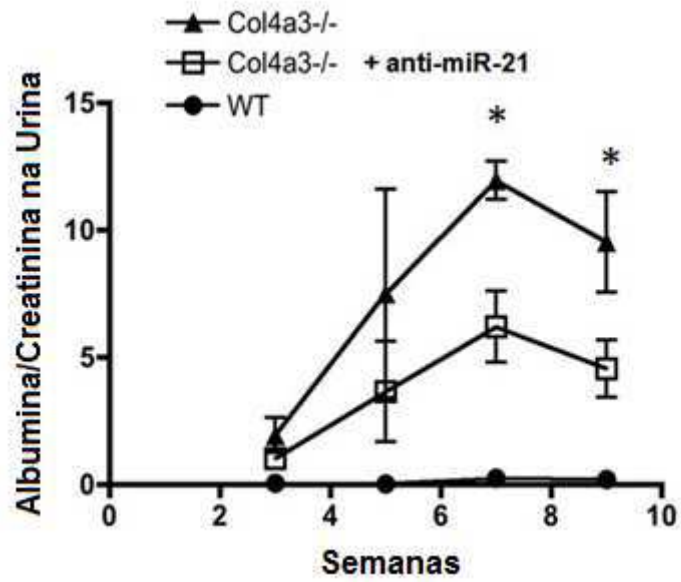


Figura 2.

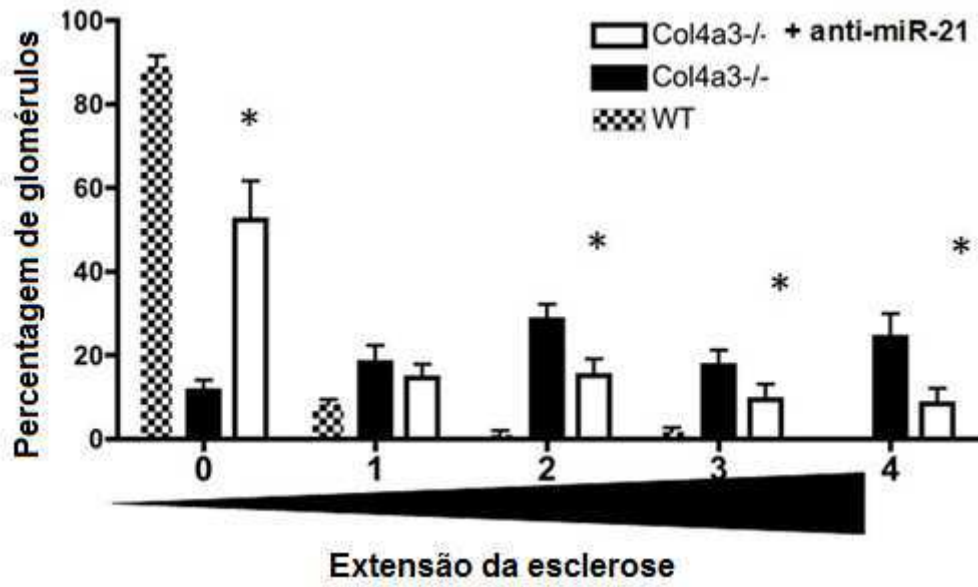
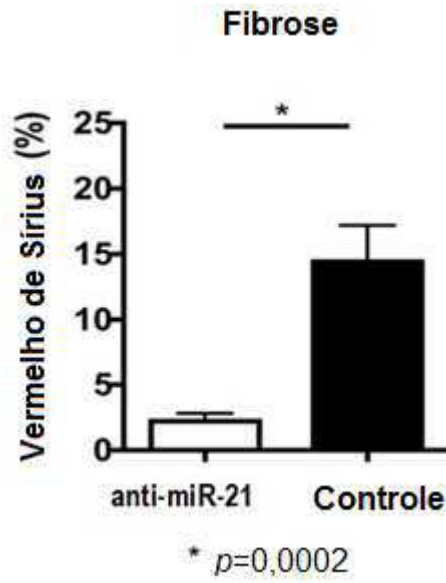


Figura 3.

A.



B.

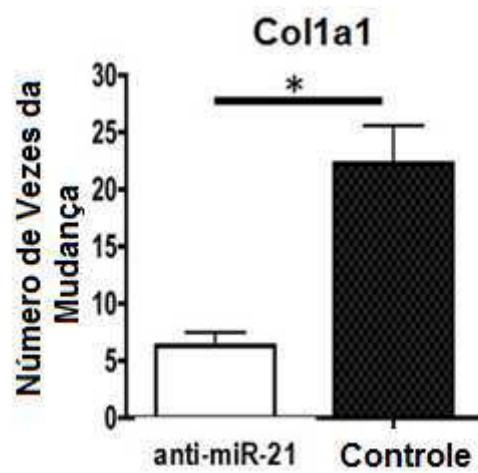
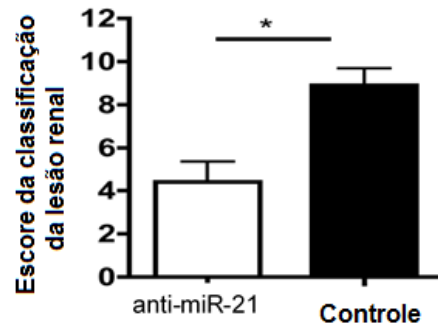
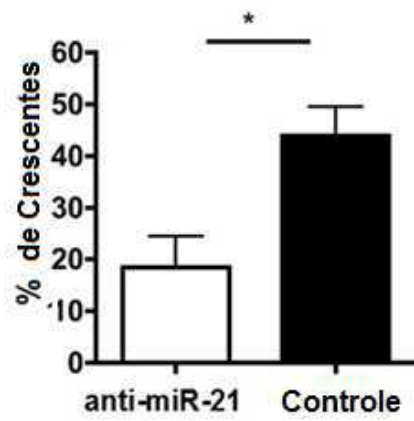


Figura 4.

A.



B.



C.

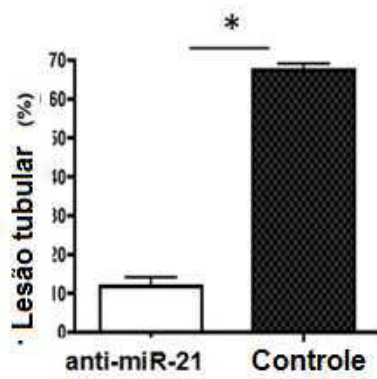
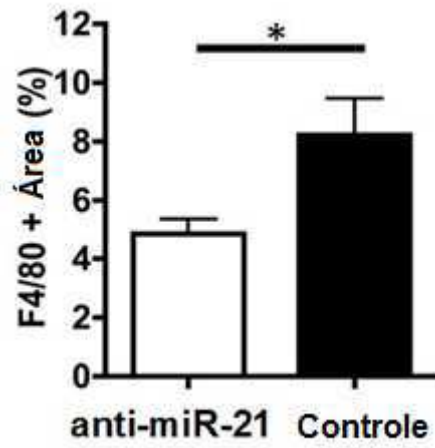


Figura 5.

A.



B.

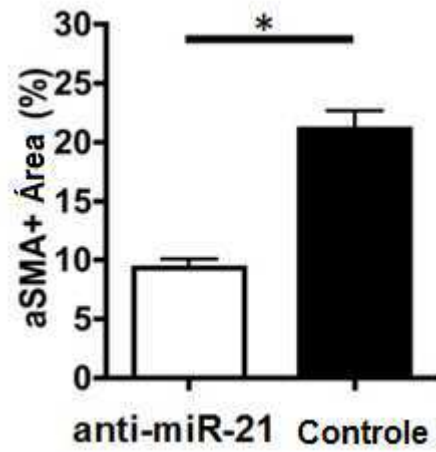
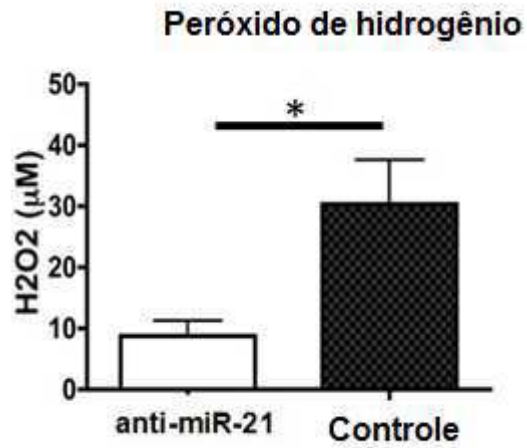


Figura 6.

A.



B.

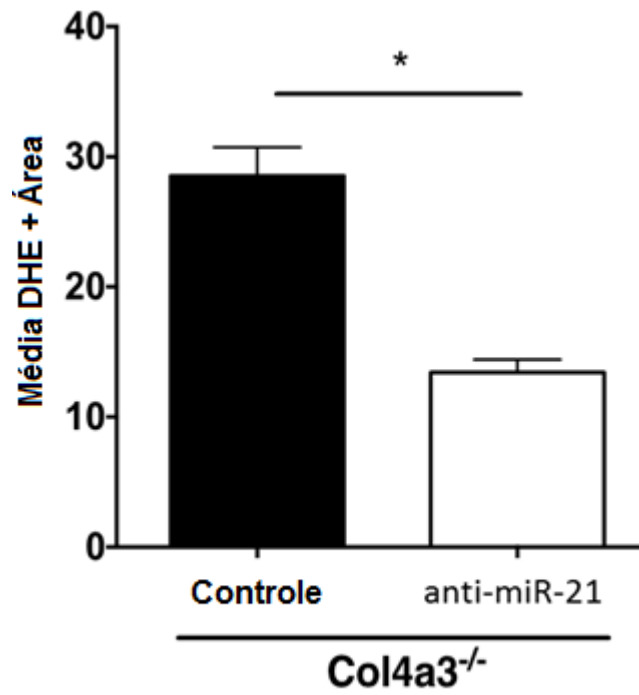


Figura 7.

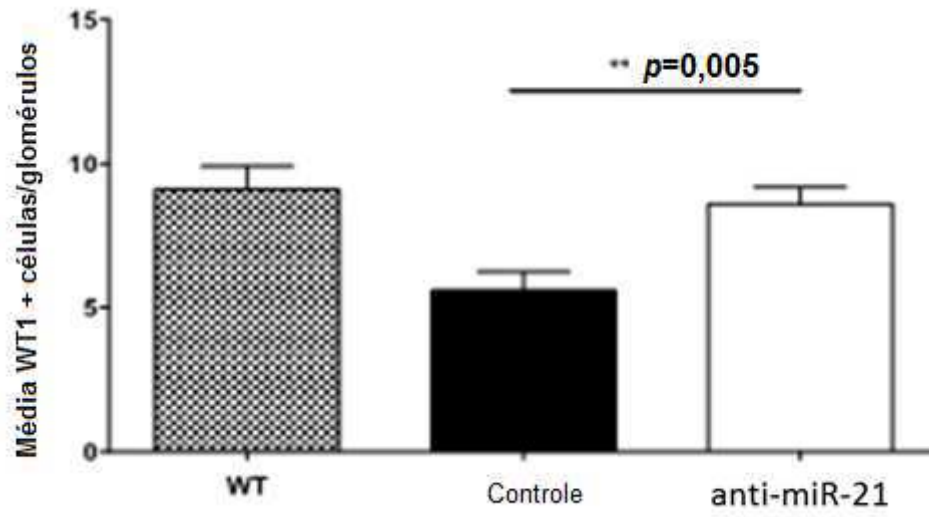
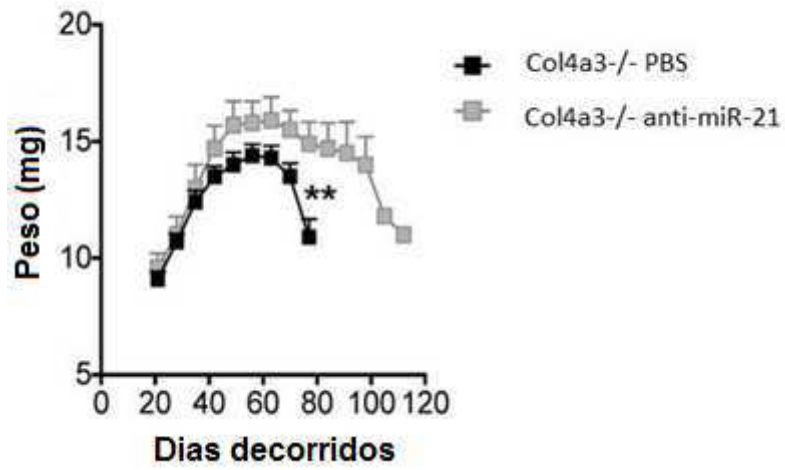


Figura 8.

A.



B.

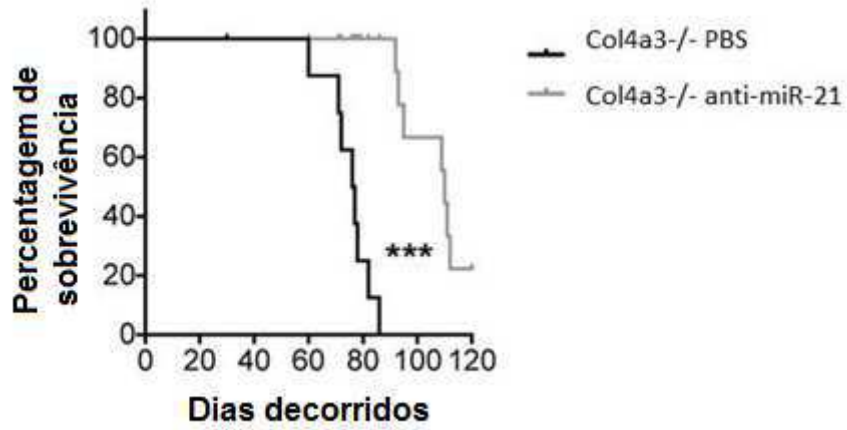
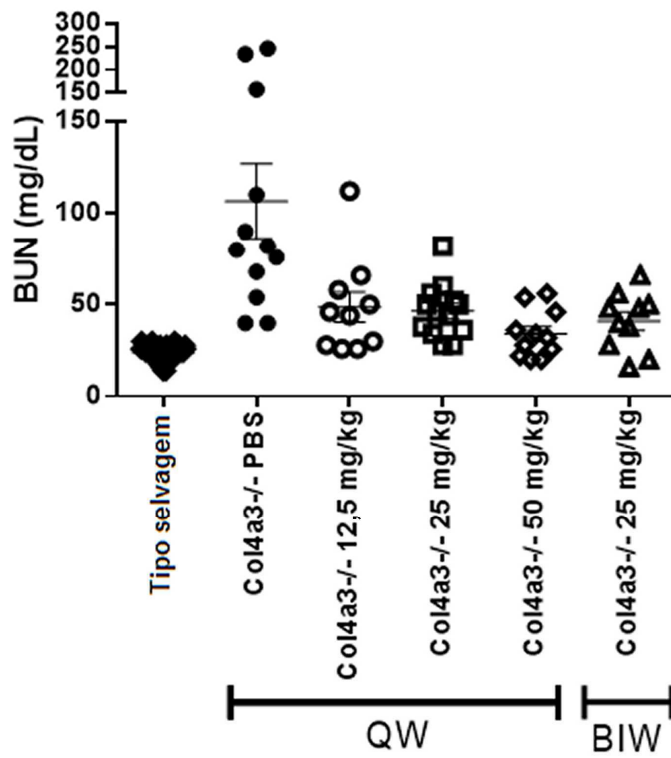


Figura 9.

A.



B.

